

**DETECÇÃO DE VÍRUS ONCOGÊNICOS (EBV, HHV8 E
SV40) EM LINFOMAS HUMANOS E CORRELAÇÃO
COM DADOS CLINICOPATOLÓGICOS**

ADRIANA HELENA MOREIRA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. José Vassallo

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Moreira, Adriana Helena

Detecção de vírus oncogênicos (EBV, HHV8 e SV40) em linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos / Adriana Helena Moreira - São Paulo, 2012.

190p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. VÍRUS ONCOGÊNICOS. 2. LINFOMA MALIGNO. 3. HERPESVIRUS HUMANO 8. 4. VÍRUS 40 DOS SÍMIOS. 5. ESTUDO MULTICÊNTRICO.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Aristeu Moreira e Helena Meschiari Moreira e filhos Lucas Moreira Girardi e Gabriel Moreira Demuner, minha eterna gratidão, pelo amor, compreensão de minhas ausências, apoio nos momentos mais difíceis e por compartilharem cada conquista ao longo destes anos e de minha vida.

Aos meus irmãos Ana Kátia Moreira e Alexandre José Moreira, cunhado(a), sobrinhos e tios (as), em especial Lisete Stella Meschiari, tão amados e que torceram por mim!

Ao pai dedicado, Valdir Geraldo Demuner, pelo amor, apoio imensurável!

À minha avó inesquecível e minha filha do coração e alma, que deixaram saudades e lições de vida, partindo para um novo caminho de existência, recentemente.

Aos meus amigos da Morada Espírita Prof. Lairi Hans, pelo auxílio de meu crescimento humano/espiritual fortalecido nas palavras de nosso Pai.

A amiga Flávia Regina Bortolotto e prima Ana Fonseca por terem me acolhido em seus lares em São Paulo, pelas palavras de conforto e carinho.

A amiga Flávia R Bortolotto pelas palavras sábias e horas de diversões. Você foi capaz de transformar sentimentos de angústias, de ansiedades, em alegria, esperança e amor fraterno. Nada na natureza, simboliza melhor o que você significa, como a flor de lótus. Esta flor encerra significados de culturas antigas asiáticas (espirituais, de pureza, e do criativo). Minha eterna gratidão!

Gostaria de oferecer um abraço fraterno, aos meus amigos, Carlos F Nascimento - "Carlinhos" e José I Neves - "Ivan", pessoas do bem, que vivem para o bem. A longa jornada espiritual pode, com certeza, explicar tamanho afeto e ternura.

A Deus, nosso pai celestial e mentor de luz, sem dúvida, fontes da vida, amor divino e de vibrações positivas, dedico este trabalho com o propósito de meu crescimento humano.

"Não são os da consanguinidade os verdadeiros laços de família e sim os da simpatia e da comunhão de idéias, os quais prendem os espíritos antes, durante e depois de suas encarnações." [A.Kardec](#)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Vassallo pela orientação deste trabalho, mas antes de tudo pela amizade, cumplicidade e dedicação para que este trabalho tenha sido finalizado, e sem dúvida pelo aprendizado recebido em todos esses anos de convívio.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares que sem dúvida acredita no crescimento de cada aluno, conduzindo seu trabalho com empenho e dedicação, no mínimo, brilhante!

Aos colaboradores da pesquisa, professores Roberto Antonio Pinto Paes, Maria Cláudia Nogueira Zerbini, Cristovam Scapulatempo-Neto dedico minha gratidão pelo empenho e auxílios administrativos, técnicos e pessoais.

À Profa Dra. Maria Cláudia N Zerbini, por mim, associada a Papoula, flor utilizada na antiguidade por egípcios e gregos, conhecedores de sua propriedade curativa. Quando oferecida ao deus do sonho Morfeu, as flores de pétalas vermelhas simbolizavam pedidos consoladores, a cor-de-rosa, calmante e a branca, a perseverança. Assim, minha querida professora, acho justo o simbolismo dado, devido a sua atitude humana, de grande sabedoria, de educação excepcional, e doses curativas recebidas com bálsamo de suas palavras. Serei eternamente grata!

Ao Prof. Dr. Roberto Pinto Paes, um abraço fraterno, especial. Pessoa de coração "gigante". Seu interesse pelo estudo, motivou-me. Obrigado, de todo o coração!

Ao Prof. Dr Cristovam Scapulatempo-Neto, sua atitude humana e caridosa, por mim, será sempre lembrada. Obrigado.

Ao amigo e pesquisador Antonio Hugo F M Campos que esteve comigo em momentos difíceis, com auxílio valoroso técnico e pessoal.

Ao Dr Victor Piana, agradeço imensamente, pelo auxílio técnico e de colaboração a pesquisa.

Aos profissionais e amigos que, sem dúvida, este trabalho não teria sido realizado Carlos Ferreira Nascimento, Severino da Silva Ferreira, Suely Nonogaki, José Ivanildo Neves.

Aos amigos da pós-graduação pelo convívio, carinho e apoio ao longo destes anos, especialmente a Adriana Bulgarelli e Alice Muglia Thomaz da Silva.

Aos profissionais do corpo administrativo da pós-graduação, que sempre estão dispostos a nos auxiliar, com empenho e carinho.

Aos meus eternos professores de outras jornadas que deixaram, sem dúvida, sementes de conhecimentos, reconhecidos pelo amor e dedicação à formação acadêmica. Dedico homenagem especial ao Prof. Dr. Silvio Santos Carvalhal (desencarnado), Prof. Dr. Norair Salviano Reis, Profa. Dra. Miralva Aparecida de Jesus Silva, Prof. José Diotto e Profa. Maria Cristina Furian Ferreira.

Ao Departamento de Anatomia Patológica e Arquivos Médicos do Hospital AC Camargo, Fundação Antonio Prudente meus agradecimentos pelo apoio dado para a elaboração e finalização deste trabalho.

Ao Departamento de Anatomia Patológica e Arquivos Médicos do Hospital de Câncer de Barretos, Hospital das Clínicas/Faculdade de Medicina das Universidades de São Paulo e de Campinas; Hospital da Santa Casa de São Paulo, pela hospitalidade e por terem me acolhido durante a coleta dos dados desta pesquisa.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela Bolsa de Formação de Pesquisador, nível doutorado.

À FAPESP – Fundação de Amparo de Pesquisa de São Paulo pelo apoio financeiro para a pesquisa.

RESUMO

Moreira AH. **Detecção de vírus oncogênicos (EBV, HHV8 e SV40) em linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Foram estudados 2693 casos de linfomas malignos de cinco instituições do estado de São Paulo, entre os anos 1954 a 2008. Dentre eles, 889 foram linfomas de Hodgkin (LH, 33%) e 1804 não Hodgkin (LNH, 67%). Objetivamos determinar a frequência de vírus linfotrópicos nos vários tipos de linfomas, em relação aos dados clinicopatológicos e aos períodos de diagnóstico. Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários dos pacientes. A pesquisa dos vírus de Epstein Barr (EBV), humano tipo 8 (HHV8) e símio-40 (SV40) foi feita nos tecidos tumorais incluídos em parafina, através da imunistoquímica e hibridização *in situ* (HIS). Dentre os dados anteriormente não explorados em nosso meio, destacaremos o que consideramos mais relevantes. O tipo esclerose nodular (ENOD) dos LH é o mais prevalente (68,2%), seguido da celularidade mista (CM; 21,8%). Houve um aumento da frequência do tipo ENOD nos períodos estudados: 61,2% em P1 (1954-1979), 69,2% em P2 (1980-1999) e 73,6% em P3 (2000-2008), porém sem significância. Apesar da alta frequência de relação dos LH com o EBV (46,9% na ENOD e 82,9% na CM), esta é significativamente mais alta em P1 (86,8% em todos os tipos) que em P2 (56,2%) e P3 (46,2%). No tipo ENOD, houve significativa redução da frequência de expressão de EBV nos três períodos, o que não ocorreu com a CM. Esta redução de relação com o EBV nos três períodos ocorreu na faixa etária estudada infanto-juvenil (menores de 15 anos) e de adultos (15-45 anos), mas não na de adultos maduros (com mais de 45 anos). A expressão de EBV esteve associada com sobrevida menos favorável apenas nas faixas inferiores aos 45 anos. Os LNH foram representados em sua maior parte pelos difusos de grandes células B (LDGCB; 56,7%), seguido pelos linfomas foliculares (LF; 19%). Os

linfomas de células do manto, cuja frequência em nosso meio ainda não havia sido relatada em grande número de casos, foi semelhante à dos outros países ocidentais, ao redor de 5%. O linfoma de Burkitt esteve associado ao EBV em 58,3% dos casos, enquanto os LDGCB, 8,8%. Em ambos não houve relação da expressão de EBV com sobrevida. A frequência de expressão do HHV8 é mínima, montando a 0,2% dos LNH e nenhum dos casos de LH. Considerou-se que 1,7% dos casos de LH tiveram positividade à HIS para SV40. Nossos dados permitem concluir que houve mudança no padrão histopatológico e da relação do LH com o EBV nos períodos estudados, caminhando no sentido de igualar-se ao dos países mais desenvolvidos. A importância do EBV para os LNH e dos demais vírus para os linfomas malignos em geral é reduzida.

SUMMARY

Moreira AH. **[Detection of oncogenic viruses (EBV, HHV8 and SV40) in human lymphomas and correlation with clinical and pathological features]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

We have studied 2693 cases of malignant lymphomas from five institutions in the state of São Paulo, Brazil, diagnosed from 1954 until 2008. Among them, 889 were Hodgkin lymphoma (HL, 33%) and 1804 non-Hodgkin lymphoma (NHL, 67%). Our purpose was to determine the frequency of lymphotropic viruses in the diverse types of lymphomas, correlating the findings with clinical and pathological data and periods of diagnostic. Clinical data was obtained from patients' records. Investigation of Epstein Barr virus (EBV), human herpes virus 8 (HHV8) and simian virus-40 (SV40) was done using immunohistochemistry and *in situ* hybridization (HIS) techniques. The nodular sclerosis type (NSHL) is the most prevalent among HL (68.2%), followed by the mixed cellularity type (MCHL; 21.8%). There was an increase in the frequency of NSHL type in the periods studied: 61.2% in P1 (1954-1979), 69.2% in P2 (1980-1999) and 73.6% in P3 (2000-2008), though without significance. Despite the high frequency of EBV in HL (46.9% in NSHL and 82.9% in MCHL), it is significantly higher in P1 (86.8% considering all subtypes) than in P2 (56.2%) and P3 (46.2%). In NSHL, there was a significant reduction in the frequency of EBV expression in the 3 periods of time, a fact that was not noticed in the MCHL type. This reduction of EBV detection considering the 3 periods occurred in two age groups: children (under 15 years old), and young adults (from 15 to 45 years old), but not in older adults (over 45 years old). EBV expression was associated with unfavorable survival only for patients under 45 years old. NHL were mainly represented by diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL; 56.7%), followed by follicular lymphoma (FL; 19%). The frequency of mantle cell lymphoma had

not yet been reported in a large number of cases in Brazil, and was similar to other occidental countries, around 5%. Burkitt lymphoma was associated with EBV in 58.3% of cases, whereas DLBCL showed this association in only 8.8%. In both cases, no association of EBV expression and survival was found. The frequency of HHV8 is minor, present in 0.2% among the NHL and none of the HL. We considered that 1.7% of the LH cases had positivity for SV40. Our data allows us to consider that there was a change in the histopathological pattern and in the association of EBV infection in HL in the periods studied, with a tendency to equal the more developed countries. In general, the importance of EBV for NHL and of the other viruses for malignant lymphomas in general is reduced in our patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ontogênese das células linfóides B e correspondência com os linfomas malignos B e seus mecanismos moleculares.....	7
Figura 2	Visão esquemática das populações linfóides T/NK e suas prováveis neoplasias correspondentes. São enumerados aqui os principais tipos de linfomas T/NK periféricos.....	9
Figura 3	Reações para o vírus de Epstein-Barr (EBV).....	45
Figura 4	Reações para o vírus Herpesvirus humano tipo 8 (HHV8).....	46
Figura 5	Reações para o vírus símio 40 (SV40).....	47
Figura 6	Linfomas de Hodgkin clássicos distribuídos em grupos etários INF (infanto juvenil até 15 anos), AD-J (adulto-jovem, 15-45 anos) e AD-M (adulto-maduro, acima de 45 anos), e frequência da expressão de EBV.....	58
Figura 7	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com LHc segundo status do EBV.....	65
Figura 8	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes EBV positivos com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos (LHc), em seguimento por 240 meses (n=455).....	65
Figura 9	Sobrevida global (SGD) de pacientes EBV positivos com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos (LHc), em seguimento por 180 meses (n=850).....	66

Figura 10	Sobrevida global (SGD) de pacientes com idade de 0-15 anos e estágio clínico Ann Arbor III-IV, com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos, em seguimento por 180 meses (n=72).....	68
Figura 11	Sobrevida global (SGD) de pacientes com idade adulta (15,1-45 anos) e estágio clínico Ann Arbor III-IV, com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos, em seguimento por 180 meses (n=200).....	69
Figura 12	Sobrevida global (SGD) de pacientes com idade adulta (>45 anos) e estágio clínico Ann Arbor III-IV, com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos, em seguimento por 120 meses (n=81).....	70
Figura 13	Linfomas de Hodgkin clássicos distribuídos em períodos de diagnóstico (P1=1954-1979; P2=1980-1999; P3=2000-2008), em relação ao número de casos e frequência de pacientes EBV positivos.....	72
Figura 14	Pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos distribuídos em períodos de diagnóstico (P1=1954-1979; P2=1980-1999; P3=2000-2008), grupos etários em relação a frequência da expressão de EBV.....	72
Figura 15	Sobrevida global de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação ao status do EBV na faixa etária infanto-juvenil entre 0-15 anos (n=175).....	82
Figura 16	Sobrevida global de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação ao status do EBV na faixa etária adulta entre 15,1-45anos (n=499).....	83

Figura 17	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação ao status do EBV na faixa etária adulta (> 45 anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV, MOPP-ABVD (n=90).....	84
Figura 18	Sobrevida global (SGD) de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa entre 0-15 anos (n=99).....	85
Figura 19	Sobrevida global (SGD) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária entre 15,1 e 45 anos (n=390).....	86
Figura 20	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária infanto-juvenil (0-15anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD (n=41).....	87
Figura 21	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária adulta (15,1-45 anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD (n=238).....	88
Figura 22	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária adulta (>45 anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD (n=50).....	89

Figura 23	Sobrevida global (SGD) de pacientes com linfoma de Burkitt, em relação ao status do EBV na faixa etária (0-15 anos), com seguimento clínico em 180m (n=87).....	97
Figura 24	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfoma DGCB que usaram o esquema CHOP, em seguimento clínico de 180m (n=261).....	102
Figura 25	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfoma DGCB que usaram os esquemas CHOP-R e CHOP-BLEO, com seguimento clínico de 60m (n=113).....	103
Figura 26	Sobrevida global (SGD) de pacientes adultos com linfoma Folicular, em seguimento clínico de 180m (n=287).....	110
Figura 27	Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes adultos com linfoma Folicular que usaram o esquema CHOP, em seguimento clínico de 60m (n=68).....	111
Figura 28	Sobrevida global de pacientes adultos mais jovens (15,1 a 60 anos) com linfoma folicular e IPI baixo + intermediário/, em seguimento clínico de 60m (n=109), segundo o status de EBV.....	114
Figura 29	Sobrevida global de pacientes todos os adultos com linfoma folicular e índice de prognóstico (0-2), com seguimento clínico de 60 m (n=206).....	115
Figura 30	Sobrevida global de pacientes adultos com linfoma T, com seguimento clínico de 3 anos (n=71).....	119

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1	Número de casos elegíveis por período de diagnóstico e instituição: linfomas de Hodgkin e Não Hodgkin.....	39
Tabela 2	Número de casos elegíveis por instituição, períodos de diagnóstico, tipos histológicos.....	39
Tabela 3	Reclassificação dos linfomas de Hodgkin, segundo a OMS (2008) (período do diagnóstico, 1954 à 2008).....	53
Tabela 4	Número de pacientes e tipos histológicos de linfoma de Hodgkin incluídos no estudo, com revisão do anatomopatológico.....	53
Tabela 5	Reclassificação dos linfomas não Hodgkin indolentes, segundo a OMS (2008) (período do diagnóstico, 1954 a 2008).....	54
Tabela 6	Reclassificação dos linfomas não Hodgkin de células B/T precursoras e periféricas, segundo a OMS (2008) (diagnósticos 1954 a 2008).....	55
Tabela 7	Classificação final dos linfomas não Hodgkin, segundo a OMS (2008) (período do diagnóstico, 1954 a 2008).....	56
Tabela 8	Dados demográficos, clinicopatológicos e “status” de EBV Pacientes com linfoma de Hodgkin Clássico (n= 850), diagnóstico 1954-2008.....	62

Tabela 9	Tipos histológicos de pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos e grupos étnicos.....	63
Tabela 10	Relação de pacientes EBV positivos com linfoma de Hodgkin clássicos, distribuídos em gêneros e regiões geográficas do país.....	63
Tabela 11	Pacientes com linfoma LHc com tratamento terapêutico ABVD ou MOPP-ABVD/ABV (n455): dados clinicopatológicos e “status” de EBV.....	64
Tabela 12	Resumo das taxas de sobrevida dos 455 pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos, que usaram os esquemas ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.....	65
Tabela 13	Resumo das taxas de sobrevida dos 850 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação à expressão de EBV.	66
Tabela 14	Resumo das taxas de sobrevida dos 72 pacientes (0-15anos) com linfoma de Hodgkin clássico e estágio clínico <i>Ann Arbor</i> III-IV, em relação à expressão de EBV.....	68
Tabela 15	Resumo das taxas de sobrevida dos 200 pacientes (15,1-45 anos) com linfoma de Hodgkin clássico e estágio clínico <i>Ann Arbor</i> III-IV, em relação à expressão de EBV.....	69
Tabela 16	Resumo das taxas de sobrevida dos 81 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (>45 anos) e estágio clínico <i>Ann Arbor</i> III-IV, em relação à expressão de EBV.....	70

Tabela 17	Pacientes com LHc EBV positivos distribuídos de acordo com o período de diagnóstico e gênero.....	73
Tabela 18	Classificação histológica de pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos (n850), de acordo com o período de diagnóstico e EBV.....	74
Tabela 19	Classificação dos tipos histológicos da esclerose nodular (graus 1 e 2) segundo o status de EBV e nos grupos etários...	75
Tabela 20	Pacientes com linfomas de Hodgkin clássicos (n=850), diagnosticados entre 1954-2008. Distribuição dos pacientes de acordo com as faixas de idade e frequência de expressão de EBV.....	77
Tabela 21	Classificação dos tipos histológicos ENOD e CM, segundo o status de EBV nos grupos etários e períodos de diagnósticos.....	79
Tabela 22	Resumo das taxas de sobrevida dos 175 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (0-15 anos), em relação à expressão de EBV.....	82
Tabela 23	Resumo das taxas de sobrevida dos 499 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (15,1-45 anos), em relação à expressão de EBV.....	83
Tabela 24	Resumo das taxas de sobrevida dos 90 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (>45 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV, MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.....	84

Tabela 25	Resumo das taxas de sobrevida dos 99 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (0-15 anos), em relação à expressão de EBV.....	85
Tabela 26	Resumo das taxas de sobrevida dos 390 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (15,1-45 anos), em relação à expressão de EBV.....	86
Tabela 27	Resumo das taxas de sobrevida dos 41 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (0-15 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.....	87
Tabela 28	Resumo das taxas de sobrevida dos 238 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (15,1-45 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.....	88
Tabela 29	Resumo das taxas de sobrevida dos 50 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (>45 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.....	89
Tabela 30	Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma não-Hodgkin.....	91
Tabela 31	Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma de Burkitt, em relação aos dados clínicos.....	95
Tabela 32	Pacientes com linfoma de Burkitt, estratificados em grupos etários, em relação aos dados clínicos.....	96

Tabela 33	Resumo das taxas de sobrevida de pacientes menores de 15 anos (n= 87) com linfoma de Burkitt, em relação à expressão de EBV.....	97
Tabela 34	Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma de DGCB, em relação aos dados clínicos.....	101
Tabela 35	Resumo das taxas de sobrevida dos 261 pacientes com linfoma DGCB que usaram esquema CHOP, em relação à expressão de EBV.....	102
Tabela 36	Resumo das taxas de sobrevida dos 113 pacientes com linfoma DGCB que usaram esquemas CHOP-R e CHOP-BLEO, em relação à expressão de EBV.....	103
Tabela 37	Pacientes adultos com linfoma DGCB, dados clínicos e EBV...	104
Tabela 38	Frequência da expressão de EBV nos pacientes adultos com linfoma de Folicular, em relação aos dados clínicos.....	109
Tabela 39	Resumo das taxas de sobrevida dos 287 pacientes com linfoma folicular, em relação à expressão de EBV.....	110
Tabela 40	Resumo das taxas de sobrevida dos 68 pacientes com linfoma folicular que usaram o esquema CHOP, em relação à expressão de EBV.....	111
Tabela 41	Pacientes adultos com linfoma folicular: dados clínicos e EBV, segundo a faixa etária com corte em 60 anos.....	113
Tabela 42	Resumo das taxas de sobrevida dos 109 pacientes com linfoma folicular (15,1-60 anos), com índices prognósticos mais favoráveis, em relação à expressão de EBV.....	114

Tabela 43	Resumo das taxas de sobrevida dos 206 pacientes com linfoma folicular (>15 anos), com índices prognósticos mais favoráveis, em relação à expressão de EBV.....	115
Tabela 44	Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma T, em relação aos dados clínicos.....	118
Tabela 45	Resumo das taxas de sobrevida dos 71 pacientes com linfoma T, em relação à expressão de EBV.....	119
Tabela 46	Frequência de expressão de EBV nos tipos de linfomas de Hodgkin clássicos e em relação à idade: análise da literatura.	143
Quadro 1	Classificação das neoplasias linfóides de acordo com a Organização Mundial da Saúde.....	5

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABVD	Esquema quimioterápico [Sigla do inglês] <i>doxorubicine bleomycin, vinblastine, dacarbazine</i>].
ABV	Esquema quimioterápico [Sigla do inglês] <i>doxorubicin, bleomycin, vinblastine</i> .
AD-J	Intervalo de idade, adulto-jovem (15,1 a 45 anos)
AD-M	Intervalo de idade, adulto-maduro (>45 anos)
AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
ALK	Produto da t(2;5); marcador tumoral de linfoma de Grandes Células Anaplásicas e linfomas B, raros.
Bcl2	Proteína reguladora da apoptose ou morte celular programada, e sua forma alterada (oncogene BCL2) aumenta a produção da proteína bcl2 e sobrevive das células linfóides e desregulam funções de c-myc, com aumento anormal proliferativo das células B.
Bcl6	Em análise conjunta anti-CD10 e Bcl6 positivos e MUM1/IRF4 negativo, distinguem padrões de diferenciação celular (centro germinativo linfoma B); papel na desregulação do ciclo celular
BKV	Poliomavírus, BK
BSA	Proteína albumina bovina
CD	[Sigla do inglês] <i>cluster of differentiation</i> ; nomenclatura proposta para classificar a maioria dos anticorpos monoclonais contra epítomos na superfície molecular dos leucócitos (moléculas de marcadores de superfície celular = receptores ou ligantes)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHOP	Esquema quimioterápico (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona)
CHOP-BLEO	Esquema quimioterápico CHOP com uso adicional de bleomicina

CHOP-R	Esquema quimioterápico CHOP com uso de anti-CD20
CM	Linfoma de Hodgkin clássico, Celularidade Mista
c-Myc	Gene humano localizado na região 8q24 (braço longo, do cromossomo 8)
c-myc	Proto-oncogene que codifica proteína nuclear que está envolvida no metabolismo de ácidos nucléicos e na mediação da resposta celular e fatores de crescimento.
COP	Esquema terapêutico (ciclofosfamida, oncovin ou vincristina e prednisona)
CTL	Células T citotóxicas
DL	Linfoma de Hodgkin clássico, Depleção Linfocitária
EBERs	Cadeias curtas de RNA não codificante, relacionado ao papel oncogênico de EBV
EBNA 1-3	Antígeno nuclear do EBV com funções distintas e interativas, entre as quais na manutenção e replicação do genoma viral
EBV	Epstein Barr Vírus
EC	Estádio clínico (Sistema <i>Ann Arbor</i> de classificação clínica dos linfomas)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético é uma substância utilizada como agente quelante criando complexos com metais pesados
ENOD 1,2	Linfoma de Hodgkin clássico, Esclerose Nodular (grau histológico 1 ou 2)
EMA	Antígeno epitelial de membrana, marcador tumoral frequente em Linfoma de Grandes Células Anaplásicas T/Null
ENOD	Linfoma de Hodgkin clássico, Esclerose Nodular
FDA	[Sigla do inglês] <i>Food and Drug Administration</i> . Órgão do governo americano responsável pela regulamentação de alimentos, suplementos alimentares e de medicamentos, cosméticos, dispositivos médicos, produtos biológicos e derivados do sangue.

FFS	[Sigla do inglês] <i>failure free survival</i> ou teste estatístico que avalia a sobrevida livre de falha
FISH	Hibridização <i>in situ</i> , por fluorescência
FLIPI	Índice de prognóstico internacional para linfoma não Hodgkin Folicular
GBTL	Protocolo terapêutico elaborado por grupo Brasileiro para tratamento de linfoma não Hodgkin na infância
HCACC/FAP	Hospital AC Camargo, Fundação Antonio Prudente
HCB/PIO XII	Hospital do Cancer de Barretos, Fundação Pio XII
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCMV	Herpesvírus tipo 5 ou Citomegalovírus humano
HCUNICAMP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Unicamp
HCV	Vírus da Hepatite C
HHV 1 à 8	Herpesvírus humano tipo 1 à 8 (4 =EBV; 8 =HHV8)
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HISCMSP	Hospital da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV1	Vírus T-linfotrópicos humanos tipo I
IL	Interleucina, tipos de proteínas produzidas principalmente por células T; macrófagos e células teciduais; a maioria envolvida na ativação dos linfócitos e na indução da divisão de outras células; cada interleucina atua sobre um grupo limitado e específico de células/receptores.
INF	Intervalo de idade, infante-juvenil (0-15 anos)
IPI	Índice de prognóstico internacional para linfomas não Hodgkin
IPS	Índice de prognóstico internacional para linfoma de Hodgkin
IR-AR	Intermediário risco a intermediário alto risco. Critério de IPI.
IR-BR	Intermediário risco a intermediário baixo risco. Critério de IPI.
JCV	Poliovírus, JC

Ki-67/Mib1	Marcador de atividade proliferativa, e utilizado para correlação de prognóstico
LANA ou LNA-1	[sigla do inglês] <i>latency-associated nuclear antigen</i> , uma proteína codificada pela seqüência viral ORF73, expresso por células da linhagem BCBL1 infectados por HHV8; proteína viral mais expressa em infecções latentes
LDGCB	Linfoma não Hodgkin, Difuso de Grandes Células B
LH	Linfoma de Hodgkin
LHc	Linfoma de Hodgkin clássico
LMB-89	Protocolo estabelecido pela Sociedade Francesa de Oncologia Pediátrica/SJCRH, para tratamento de linfomas
LMP-1	Proteína latente de membrana, tipo 1 do EBV
LNH	Linfoma não Hodgkin
MOPP	Esquema quimioterápico [Sigla do inglês] <i>mechlorethamine, vincristine, procarbazine, prednisone</i> .
MPC	Morto por outra causa
MPD	Morto pela doença
NaN3	Azida sódica
N-CL	Linfoma de Hodgkin ou Não-Hodgkin não classificáveis
NF-κB	Fator nuclear kappa B é um complex proteico que desempenha função de fator transcricional, envolvido em resposta celular a estímulos como de antígenos virais, citocinas entre outras. Papel importante na resposta imunitária à infecção.
N-NE-CO	Regiões geográficas brasileiras, Norte, Nordeste e Centro-Oeste
OMS/WHO (2008)	[sigla do inglês] <i>World Organization Classification of Tumors, Hematopoietic and lymphoid tissues</i> ; Organização Mundial da Saúde que estabelece critérios de classificação dos linfomas (desde 1995) por membros da Sociedade de Hematopatologia e da Associação Européia de

Hematopatologistas, segundo bases de dados morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e de informações clínicas.

ORF	[sigla do inglês] <i>open reading frame</i> ; sequência do genoma
ORI	Origem de replicação, sequência de nucleotídeos
P1-P3	Intervalo de período de diagnóstico (1954-1979; 1980-1999 e 2000-2008)
p53	Produto do gene supressor de tumor, de mesmo nome. Importante marcador tumoral e de correlação prognóstica
PBS	[sigla do inglês] phosphate buffered saline, solução tampão salina que contém cloreto de sódio, fosfato de sódio e variações de formulações, cloreto de potássio e fosfato de potássio. Mantém pH constante (isotônico) e diluente biomolecular.
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PCR-RT	Reação da polimerase em cadeia em tempo real
PEL	Linfoma não Hodgkin de Efusão primária, cavidades serosas
PLM	Linfoma não Hodgkin, Plasmablastico
PLN	Linfoma de Hodgkin, Predomínio linfocítico nodular
pRb	Proteína supressora de tumoral, produto gênico que leva o mesmo nome (retinoblastoma). Utilizado como marcador tumoral e de significado prognóstico.
PT	Intervalo de período de diagnóstico (1954-2008)
QT	Quimioterapia
RL	Linfoma de Hodgkin clássico, Rico em Linfócitos
RT	Radioterapia
SD	Sem dados
SDE	Sobrevida doença específica
SES	<i>Status</i> socioeconômico
SGD	Sobrevida global de doença
SK	Sarcoma de Kaposi
SLD	Sobrevida Livre de doença
SNC	Sistema Nervoso Central

SOE	Linfoma/Tipo, sem outra especificação
S-SE	Regiões geográficas brasileiras, Sul e Sudeste
SV40	Poliomavírus, Símio vírus 40
T/NK	Linfoma não Hodgkin, origem de linfócitos T/ do inglês [<i>Natural Killer</i> ; pertence ao sistema imune inato com atividade citotóxica antiviral]
T1.1	RNA mensageiro viral/HHV8 que se acumula no núcleo das células infectadas com um grande número de cópias
Tag/TAg	Antígenos T pequeno e T grande, codificado por genes virais de região precoce, transcritos antes da replicação do DNA e expressos logo após a infecção das células hospedeiras. Papel na transcrição, replicação do genoma viral, sinalização celular e progressão do ciclo célula da célula hospedeira (TAg); menos claro (Tag).
Tdt	[Sigla do inglês] <i>deoxinucleotidil transferase terminal</i> , presente em células B-1 (subtipo de células B, secretoras de imunoglobulinas) com limitação de receptores (BCR) devido a falta dessa enzima (auto-reativas). Essas células e linfócitos T apresentam CD5, e presentes em linfomas Manto e LLC.
TMA	[Sigla do inglês] <i>Tissue Microarray</i>
TNF	Fator de necrose tumoral, refere-se a um grupo de citocinas envolvida em inflamação e morte celular
TRADD	Os receptores TNF estão associados a pró-caspases através das proteínas TRADD que clivam outras pró-caspases e desencadeiam cascatas de sinais apoptóticos.
TRAFs	Receptores de sinais intracelulares
VCD	Vivo com doença
VP1-3	Proteínas estruturais de capsídeo viral VP1-2-3 (codificados por genes da região tardia), que se reúnem com o DNA viral replicado para formar vírions.
VSD	Vivo sem doença

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Ontogênese dos linfomas malignos.....	5
1.2	Epidemiologia dos linfomas	10
1.3	Vírus	12
1.3.1	Herpesvirus humanos.....	17
1.3.2	Poliomavírus, Vírus Simio 40 (SV40)	28
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivos Geral.....	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	METODOLOGIA	37
3.1	Pacientes.....	37
3.2	Critérios de inclusão	38
3.3	Critérios de exclusão	38
3.4	Ética	40
3.5	Amostras	40
3.6	Imunoistoquímica	41
3.7	Hibridização <i>in situ</i>	43
3.8	Estudo clinicopatológico	48
3.9	Testes estatísticos	49
4	RESULTADOS	51
4.1	Linfomas e classificação histológica	51
4.2	Linfomas de Hodgkin e Epstein Barr vírus.....	57
4.2.1	Linfoma de Hodgkin clássico: pacientes EBV positivos estratificados por períodos de diagnóstico	71
4.2.2	Tipos histológicos Vs. períodos de diagnóstico	73

4.2.3	Linfoma de Hodgkin clássico: pacientes EBV positivos estratificados por idade.....	75
4.2.4	Linfoma de Hodgkin clássico ENOD e CM: pacientes EBV positivos estratificados por idade e períodos de diagnósticos.....	76
4.2.5	Análise de sobrevida de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação a idade, terapêutica e tipo histológico.....	79
4.3	Linfomas não Hodgkin e Epstein Barr Vírus.....	90
4.3.1	Linfoma de Burkitt.....	92
4.3.2	Linfoma Difuso de grandes células B.....	98
4.3.3	Linfoma Folicular.....	105
4.3.4	Linfomas T.....	116
4.4	Linfomas e HHV8.....	120
4.5	Linfomas e SV40.....	122
4.6	Linfoma de Hodgkin e HIV, considerações finais.....	124
4.7	Linfoma não Hodgkin e HIV, considerações finais.....	125
5	DISCUSSÃO.....	127
5.1	Linfomas de Hodgkin e EBV.....	127
5.1.1	Dados clínicos e sobrevida de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico e status de EBV.....	134
5.1.2	Dados clínicos e de sobrevida, em relação a expressão de EBV dependente da idade do paciente.....	136
5.2	Linfomas não Hodgkin e EBV.....	145
5.3	Linfomas de Hodgkin e não Hodgkin B, HIV/EBV.....	150
5.4	Linfomas T e EBV.....	155
5.5	Linfomas e HHV8.....	157
5.6	Linfomas e SV40.....	158
6	CONCLUSÕES.....	162
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164

ANEXOS

- Anexo 1** Identificação dos colaboradores do projeto e documentos de aprovação do projeto multicêntrico.
Características dos serviços hospitalares colaboradores com o projeto
- Anexo 2** Protocolo de reação de Imunoistoquímica e Hibridização *in situ* para detecção de oncovírus EBV, HHV8 e SV40.
- Anexo 3** Ficha de paciente – dados clinicopatológicos.

APÊNDICES

- Apêndice 1** Painéis imunoistoquímicos aplicáveis em tecidos parafinados para o diagnóstico de linfomas malignos.
- Apêndice 2** Critérios clínicos bem estabelecidos na literatura: suporte de estudo para descrições de siglas e conceitos de critérios clínicos. Estadiamento e tratamento terapêutico (linfomas não Hodgkin e de Hodgkin).

1 INTRODUÇÃO

Os linfomas correspondem a um grupo heterogêneo de neoplasias derivadas de células linfóides B e T/NK que, juntamente com as demais neoplasias hematológicas perfazem cerca de 10% dos tumores malignos. A descrição de um tumor de linfonodos foi feita pela primeira vez pelo cirurgião inglês Thomas Hodgkin em 1832. Este tumor recebeu posteriormente o nome de Doença de Hodgkin. Poucos anos depois, em 1845, Virchow descreveu a leucemia e, em 1864, descreveu o processo que denominou “leucemia aleucêmica” e que mais tarde viria a ser chamado de linfoma não Hodgkin.

O termo linfossarcoma foi cunhado para descrever neoplasias linfóides em 1892 por Dreschfeld e em 1893 por Kundrat. Ainda na passagem do século XIX para o XX, Sternberg, em 1898 e Dorothy Reed, em 1902, descreveram os detalhes histológicos da doença de Hodgkin, em particular as células que viriam a receber seus nomes, as células de Reed-Sternberg.

Durante o século XX, várias entidades patológicas foram sendo descritas, como o linfoma folicular (por Brill, em 1926 e Symmers, em 1927), o reticulossarcoma (por Roulet, em 1930), o linfoma africano endêmico por (por Burkitt 1958), o linfoma linfoblástico (por Barcos e Lukes 1973), o linfoma/leucemia de células T do adulto (por Uchiyama, em 1977), o conceito de linfoma do tecido linfóide associado às mucosas (por Isaacson e

Wright 1978), além de outras doenças. Neste século, surgiu em 1956 a classificação de Rappaport, de cunho puramente morfológico, que foi amplamente aplicada na clínica durante várias décadas. As citações da literatura são descritas por AISENBERG (2000) e JAFFE et al. (2008).

Foi apenas em 1973 que o grupo de Karl Lennert, em Kiel, Alemanha, descreveu as funções do folículo linfóide e associou sua classificação ao desenvolvimento ontogenético dessa estrutura. Nesta classificação já eram introduzidos conceitos imunológicos na denominação dos linfomas. A partir dos anos 1980 e 1990 pesquisas moleculares acrescentaram conhecimentos que viriam a culminar com o surgimento da nomenclatura REAL em 1994, que foi adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2001 e atualizada em 2008 (HARRIS et al. 1994; JAFFE et al. 2008; ZERBINI et al. 2011).

Um histórico dos linfomas pode ser encontrado nas excelentes revisões de AISENBERG (2000) e JAFFE et al. (2008). Atualmente, as neoplasias linfóides dividem-se em linfomas de Hodgkin (LH), quase que exclusivamente derivados de células B e não-Hodgkin (LNH), derivados de células B ou T/NK. Segundo a nova nomenclatura da OMS cerca de 100 tipos são descritas, baseando-se em dados clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e moleculares (CAMPO et al. 2011).

Do ponto de vista patogenético, os linfomas correspondem a proliferações clonais de células B e T/NK, cada qual correspondente a uma das etapas da ontogênese destas células, desde a sua origem na medula óssea, até os órgãos linfóides secundários. A maior parte deles é originada

em centros germinativos, com diferentes mecanismos oncogênicos, como a translocação t(14;18) nos linfomas foliculares, t(11;14) nos linfomas de células do manto, t(8;14/22/2) nos linfomas de Burkitt e t(2;5) nos linfomas de grandes células anaplásicas, para citar apenas as alterações mais frequentes (KLUIN e SCHUURING 2011). Embora seja reconhecido o fato de que essas anomalias moleculares promovam alterações no ciclo de proliferação celular e apoptose, o determinante dessas alterações é conhecido apenas parcialmente, como é o caso dos vírus linfotrópicos sobre os quais discorreremos mais extensamente adiante. Constituem fatores relacionados à etiopatogenia dos linfomas malignos a predisposição genética, a exposição à radiação e os quimioterápicos, a imunodesregulação congênita ou adquirida.

O reconhecimento dos mecanismos moleculares e consequente compreensão da biologia dos linfomas têm implicações na prática clínica, podendo levar à descoberta de marcadores específicos para o aprimoramento do diagnóstico e da avaliação de doença residual mínima, de possíveis alvos terapêuticos e de grupos moleculares de prognósticos diferentes (NOGAI et al. 2011). Esses estudos têm levado à separação de entidades patológicas, anteriormente consideradas únicas ou à fusão de outras consideradas diversas. Isto deve contribuir, no futuro, para a terapêutica a mais específica possível, base da Medicina Personalizada.

O Patologista, como profissional que determina a nomenclatura das neoplasias para uso do Oncologista, tradicionalmente baseava a terminologia dos linfomas apenas por meio da morfologia. Na moderna

nomenclatura das neoplasias hematológicas, a morfologia é apenas mais uma das ferramentas, embora fundamental, aplicável na prática diagnóstica. Por levar em consideração os aspectos clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e moleculares, para se chegar a uma definição de entidade, não há preponderância de nenhuma dessas abordagens sobre as demais (HARRIS et al. 1994). Ora, desses métodos, o mais raramente encontrado nos centros de diagnóstico de neoplasias é o método molecular.

Muitos laboratórios de Patologia que trabalham em íntimo contato com os Oncoematologistas e dispõem de imunoistoquímica podem avançar no diagnóstico da maior parte dos casos de linfomas, ficando menos de 10% deles na dependência de métodos disponíveis em centros mais equipados (hibridização *in situ* fluorescente, FISH; reação em cadeia da polimerase, PCR, e outros). Desta forma, as últimas décadas têm testemunhado o avanço de marcadores fidedignos aplicáveis a tecidos rotineiramente processados (fixados em formalina e incluídos em parafina) para estudos imunoistoquímicos (GARCIA e SWERDLOW 2009). No **Apêndice 1** podem ser vistos os painéis úteis na classificação dos linfomas malignos, preconizados na literatura e utilizados no presente estudo. No **Quadro 1** os principais tipos de linfomas são enumerados.

Quadro 1 - Classificação das neoplasias linfoides, de acordo com a Organização Mundial da Saúde

LINFOMA DE HODGKIN
Predominância linfocitária nodular
Clássico
Esclerose nodular
Celularidade Mista
Rico em linfócitos
Depleção linfocitária
NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFÓIDES B
CÉLULAS PRECURSORAS/ IMATURAS
Linfoma/ leucemia linfoblástica
CÉLULAS PERIFÉRICAS/ MADURAS
Linfoma linfocítico/ leucemia linfóide crônica
Linfoma linfoplasmocítico
Linfoma da zona marginal nodal
Linfoma da zona marginal extranodal
Linfoma da zona marginal esplênica
Tricoleucemia
Linfoma folicular
Linfoma de células do manto
Linfoma difuso de grandes células B
Linfoma de grandes células B mediastinal
Linfoma de Burkitt
NEOPLASIAS DE CÉLULAS LINFÓIDES T/NK
CÉLULAS PRECURSORAS/ IMATURAS
Linfoma/ leucemia linfoblástica
CÉLULAS PERIFÉRICAS/ MADURAS
Linfoma T periférico, sem outra especificação
Linfoma T angioimunoblástico
Linfoma T/NK nasal e tipo nasal
Linfoma de grandes células anaplásicas CD30+

Fonte: Adaptado de CAMPO et al. (2011)

1.1 ONTOGÊNESE DOS LINFOMAS MALIGNOS

A maior parte dos linfomas tem origem nos centros germinativos dos folículos linfóides: os linfomas foliculares, maior parte dos linfomas difusos de grandes células B e os linfomas de Hodgkin (KLEIN e DALLA-FAVERA

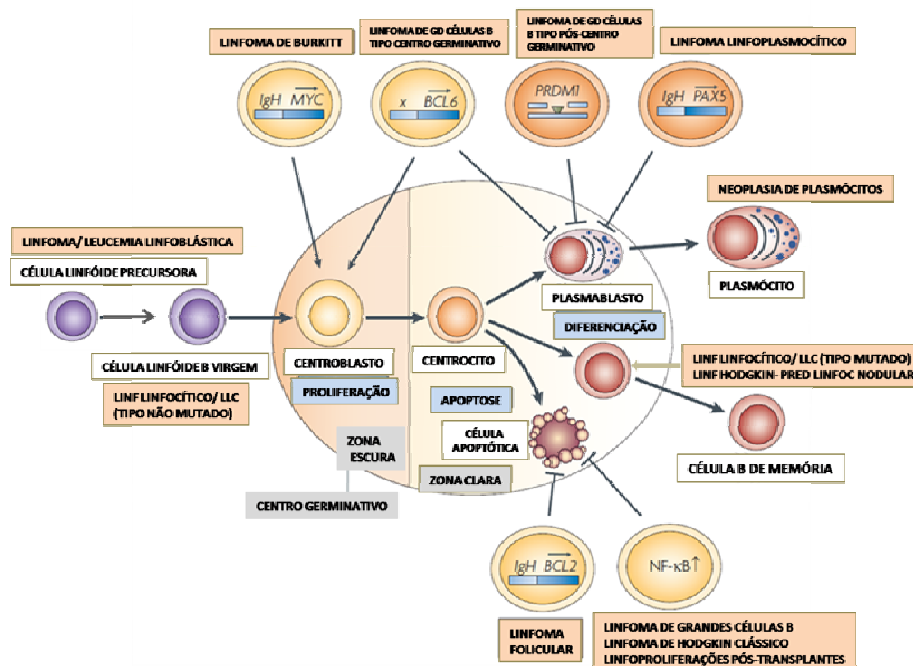
2008). Estes três grupos perfazem cerca de $\frac{3}{4}$ de todos os linfomas malignos. Outro tipo, menos frequente, corresponde ao linfoma de Burkitt.

Na **Figura 1**, podemos observar a histogênese da maior parte das neoplasias linfóides B, bem como as respectivas alterações moleculares: 1) neoplasias de células B precursoras (linfoma linfoblástico/ leucemia linfóide aguda B): originadas geralmente na medula óssea, de células imaturas, que expressam TdT (deoxinucleotidil transferase terminal); 2) neoplasias de células B maduras virgens: leucemias linfóides crônicas não mutadas (40-50%, sendo o restante de células que passaram pelo centro germinativo, ou mutadas); 3) neoplasia da zona do manto: os linfomas de células do manto têm origem suspeitada em uma célula B virgem (pré-centro germinativo) dessa região folicular; 4) neoplasias da zona marginal: enquanto os linfomas da zona marginal nodal e os primários das mucosas são correspondentes a células da zona marginal pós-centros germinativos, os linfomas da zona marginal esplênica apresentam esse perfil genético em apenas metade dos casos.

Das neoplasias dos centros germinativos, mecanismos oncogênicos diversos correspondem às entidades clinicopatológicas distintas. O LH com predominância linfocitária nodular apresenta todas as características da fase de maturação do centroblasto (expressão de CD20 e Bcl6). Tanto os linfomas foliculares, quanto os LH clássicos correspondem a células anômalas dos centros germinativos que foram resgatadas da apoptose, com diferenças: os linfomas foliculares mostram a característica translocação t(14;18), expressão de CD20 e de Bcl6, sendo negativos para MUM1

(marcador de células B pós-centros germinativos ativadas e plasmócitos). Nesses linfomas, o resgate da apoptose é dado pela hiperexpressão da proteína Bcl2.

Os LH clássicos não apresentam essa translocação, geralmente são negativos para CD20 e Bcl6 e expressam MUM1 e o marcador de ativação CD30. Neste caso, o resgate da apoptose é dado pela hiperexpressão de NF-κB, quer pela sua indução por meio da proteína latente de membrana do vírus de Epstein-Barr, quer pelo defeito do gene inibidor dessa proteína antiapoptótica (iNF-κB). Mesmo no caso dos LH clássicos com expressão de Bcl2 (cerca de 65% dos casos, VASSALLO et al. 2003), esta não se deve ao mesmo mecanismo da sua acumulação nos linfomas foliculares.



Fonte: Adaptado de KLEIN e DALLA-FAVERA (2008)

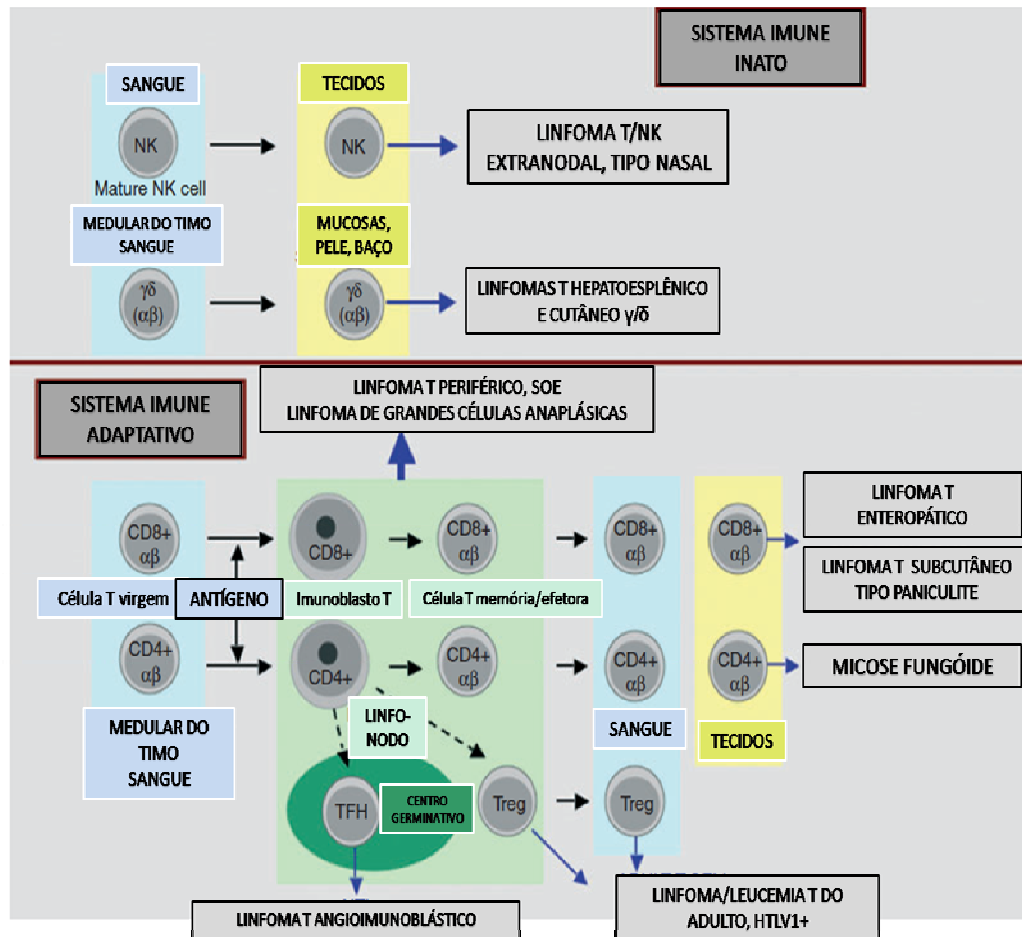
Figura 1 - Ontogênese das células linfóides B e correspondência com os linfomas malignos B e seus mecanismos moleculares.

Enquanto boa parte dos linfomas B tem sua ontogênese relativamente mais bem conhecida, a biologia dos linfomas de células T está sendo desvendada mais recentemente, porém muitas lacunas ainda restam. Isto reflete a complexidade da imunidade celular T/NK (GEISSINGER et al. 2006; DE LEVAL e GAULARD 2011).

Resumidamente, células T/NK do sistema inato, que apresentam as cadeias γ/δ dos receptores de células T e perfazem menos de 5% das células T do sangue periférico, dão origem aos linfomas T/NK extranodais do tipo nasal e aos linfomas hepatoesplênico e cutâneo γ/δ . Os demais linfomas originam-se de subpopulações de células T do sistema imune adaptativo, as quais apresentam as cadeias α/β dos receptores de células T. Destes, a maior parte se origina de células T CD4+ moldadas por antígeno: linfomas T periféricos sem outra especificação (SOE), linfoma de grandes células anaplásicas e micose fungóide. O linfoma T angioimunoblástico apresenta a particularidade de expressar marcadores de centros germinativos (CD10 e Bcl6), supondo-se que se origine de linfócitos T CD4+ foliculares. Alguns linfomas, como o T enteropático, o subcutâneo tipo paniculite e outros raros originam-se de células T CD8+ (**Figura 2**). Em decorrência, marcadores imunistoquímicos podem ser de grande auxílio na caracterização de tipos especiais de linfomas de células T/NK (**Apêndice 1**).

Quanto às alterações citogenéticas, a mais frequente é a t(2;5) presente em 75% dos casos de linfoma de grandes células anaplásicas CD30+ e ALK+. Outros 10-20% destes casos apresentam a translocação t(1;2). Outros tipos de linfomas T apresentam alterações genéticas, porém

devido à baixa frequência destes tumores e à variabilidade de anomalias, não serão referidas nesta revisão (DE LEVAL e GAULARD 2011).



[Abreviaturas: NK: *natural killer*; SOE: sem outra especificação; HTLV1: *human T cell lymphoma/leukemia virus 1*; TFH: linfócito T-*helper* folicular; Treg: linfócito T regulatório]

Fonte: Adaptado de DE LEVAL e GAULARD (2011).

Figura 2 - Visão esquemática das populações linfóides T/NK e suas prováveis neoplasias correspondentes. São enumerados aqui os principais tipos de linfomas T/NK periféricos.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DOS LINFOMAS

As neoplasias hematopoéticas perfazem cerca de 8% das neoplasias malignas e respondem por cerca de 7% das mortes por câncer nos Estados Unidos e Europa. Das neoplasias hematológicas, as leucemias de todos os tipos e os linfomas não Hodgkin perfazem cerca de 35% cada e os linfomas de Hodgkin e neoplasias de plasmócitos/ mieloma múltiplo 15% cada (RODRIGUEZ-ABREU et al. 2007; ROMAN e SMITH 2011).

Dentre os linfomas não Hodgkin, 80-90% são de imunofenótipo B e o restante T/NK. Sua incidência é maior no sexo masculino e pode haver considerável variação entre as regiões geográficas. Por exemplo, há taxas mais reduzidas de linfomas malignos em países asiáticos. Em particular, no Japão há incidência 4-5 vezes menor de leucemia linfóide crônica B que no ocidente e os linfomas de Hodgkin são raros, enquanto linfomas de células T são mais frequentes, dada a endemia de infecção pelo Vírus humano linfotrópico T tipo 1 (HTLV1). Neste país, um estudo refere 50% de linfomas não Hodgkin B, 42% de linfomas T e 4% de linfomas de Hodgkin (OHSHIMA et al. 2002).

A faixa etária também é importante na distribuição das neoplasias hematológicas. A faixa etária pediátrica e juvenil têm mais frequentemente neoplasias de células linfóides precursoras (principalmente B) e menos frequentemente linfomas de Hodgkin. Estes atingem pico de incidência entre a 2-3ª décadas (VASSALLO et al. 2005). Adultos mais velhos apresentam mais frequentemente linfomas B agressivos ou indolentes. Nos Estados

Unidos, as neoplasias linfóides correspondem a 44 casos/100000 hab/ano, sendo que as B maduras perfazem cerca de 30 casos/100000 hab/ano (principalmente linfoma difuso de grandes células B, leucemia linfóide crônica, mieloma e linfoma folicular). As neoplasias linfóides T/NK perfazem cerca de 2,5 casos/100000 hab/ano, as de células precursoras (B e T) 2,0 casos/100000 hab/ano e os linfomas de Hodgkin 3,3 casos/100000 hab/ano (MORTON et al. 2006).

No Brasil, de acordo com a média das taxas brutas encontradas nos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), estima-se que o número de casos novos (incidência) de Linfomas de Hodgkin em 2009 foi de 2870 novos casos, sendo 1.600 para o sexo masculino e 1.270 para o sexo feminino (Ministério da Saúde 2008). E, para linfoma não Hodgkin estima-se que em 2012 ocorra 5190 casos novos para homens (5 casos/100000hab/ano) e 4.450 casos novos em mulheres (4 casos/100000 hab/ano), (Ministério da Saúde 2011). Esses dados comparados aos dos Estados Unidos sugerem subnotificação desses casos no Brasil.

Na Europa, os dados são semelhantes (SANT et al. 2010). Interessante notar que, além da menor incidência no sexo feminino, nos Estados Unidos os indivíduos de origem asiática e nativos americanos têm incidência mais baixa dessas neoplasias, com exceção dos linfomas de células T. Os linfomas B correspondem a menos da metade da incidência de brancos/negros e os linfomas de Hodgkin a seis vezes menos que dos brancos/negros (MORTON et al. 2006).

Do ponto de vista etiológico, vários fatores foram aventados para aumento do risco de linfomas: autoimunidade e outras imunodesregulações congênitas ou adquiridas, infecções (HIV, EBV, HHV8, *H. pylori* etc), radiação, medicamentos (quimioterápicos), pesticidas e outros produtos agrícolas, hábitos de vida, poluentes e predisposição genética (RODRIGUEZ-ABREU et al. 2007; MORTON et al. 2008). Para aumento do risco de leucemias, incluem-se a esses fatores alterações genéticas, como portadores de síndrome de Down e Klinefelter (RODRIGUEZ-ABREU et al. 2007). Destes, os vírus têm mostrado importantes relações com os linfomas, motivando o presente estudo.

1.3 VÍRUS

Os vírus como agentes envolvidos na patogênese de linfomas têm relação espécie-específica e, dentro da espécie humana, variação nos diversos grupos de acordo com faixa etária, distribuição geográfica e fatores individuais, como o estado imune (BALMAIN et al. 2003). O papel dos vírus nas neoplasias humanas é apoiado por evidências derivadas da observação das alterações fenotípicas em células infectadas experimentalmente ou por transfecção de genes virais em diferentes modelos de estudos *in vitro* e *in vivo* (BOCCARDO e VILLA 2004). Estudos sobre o papel dos vírus na oncogênese podem levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, tendo-os como alvos (GHOSH et al. 2012).

Dados da epidemiologia molecular apoiam conceitos sobre mecanismos importantes na distribuição das doenças, bem como sobre fatores etiológicos (PRESTON 2003). No mundo ocidental, os linfomas de células B correspondem a 85-90% de todos os Linfomas Não-Hodgkin (LNH). A sua patogênese, distribuição geográfica e populacional, tem sido relacionada a oncovírus (RIZVI et al. 2006) e o estado imune do paciente (HAMILTON-DUTOIT et al. 1991; HJALGRIM et al. 2003; SHAH et al. 2003; ABOULAFIA et al. 2004).

Esses vírus apresentam relação com a transformação celular, agindo essencialmente nos mecanismos de controle da apoptose e da divisão celular. Basicamente, os vírus oncogênicos induzem a maior proliferação e a resistência da célula transformada à apoptose. Estes efeitos resultam na maior possibilidade de exposição da célula “imortalizada” a novas alterações do genoma que levam à proliferação celular irresponsiva aos mecanismos regulatórios, angiogênese sustentada e metastatização (D’SOUZA et al. 2004; VOCKERODT et al. 2008).

Proteínas e genes virais podem ser abundantemente expressos em linfomas com infecção latente, promovendo interação com proteínas intracelulares inibindo mecanismos de apoptose (IFN- α e γ), citocinas (IL-10) formando complexos com NF κ -B e modulando atividades de sinalização do sistema imune com persistência viral (IWAKIRI e TAKADA 2010; SAHA e ROBERTSON 2011).

Nesse contexto, como exemplo, alguns vírus podem integrar o genoma nas proximidades de proto-oncogenes, alterando a sua expressão

e/ou atividade (ativação insercional). Os DNA-vírus pequenos, dependentes da maquinaria celular do hospedeiro, estimulam as células quiescentes e/ou diferenciadas a programar os mecanismos de replicação (BOCCARDO e VILLA 2004). As vias de entrada no hospedeiro são descritas segundo a razão ligante/receptor de membrana, sem danos ao alvo, propiciando sua fusão. Supõe-se que os herpesvírus se liguem a vários receptores da célula-alvo, e um pode ser suficiente para a sua internalização celular (SPEAR e LONGNECKER 2003).

LIAO (2006) reporta em estudo revisional sobre grupos de vírus de DNA ou RNA, e os mais relacionados ao câncer em seres humanos são: o Epstein-Barr vírus (EBV), o Papiloma Vírus Humano (HPV), Herpesvírus Humano-8 (HHV-8); Vírus Humano Linfotrófico T tipo um (HTLV-1). Com exceção do HPV, os demais têm grande importância no estudo da patogênese dos linfomas malignos.

Outros vírus que têm se mostrado relacionados à patogênese de linfomas, embora de modo mais inconsistente, são o vírus da hepatite C (HCV) (JARRETT 2006; ENGELS 2007) e o vírus símio-40 (SV40), (JARRETT 2006). Proteínas e genes virais têm sido relacionados à patogênese da doença, como: os antígenos nucleares do EBV (EBNA e LP), proteínas de membranas (LMP), além de pequenos RNAs (EBERs) (JARRETT 2006); o antígeno nuclear associado à latência (LANA) do HHV8 e o antígeno T grande (TAg) em poliomavírus (SV40, BKV e JCV) (PAGANO et al. 2004).

A frequente associação com linfomas B em pacientes imunodeficientes, desordens linfoproliferativas diferem na expressão das proteínas latentes virais, levando à imortalização e transformação maligna de forma coordenada aos mecanismos da célula hospedeira. Recentes estudos enumeram mecanismos moleculares para intervenção terapêutica ao EBV em linfomas (SAHA e ROBERTSON 2011).

Na detecção de vírus em neoplasias, dois métodos mostram-se adequados para permitir o estudo retrospectivo em grande quantidade de tecidos fixados e parafinados. Um deles é a imunistoquímica e outro a hibridização *in situ*. Embora em muitos casos a reação em cadeia da polimerase (PCR) seja possível a partir de material parafinado arquivado, o rendimento pode ser baixo a depender da qualidade de fixação e preservação do DNA (VASSALLO et al. 2002).

Para o estudo imunistoquímico, dispomos do anticorpo anti-LMP1 (proteína latente de membrana) do EBV, do anticorpo anti-LANA-1 (*latency-associated nuclear antigen*, uma proteína codificada pela seqüência viral ORF73, expresso por células da linhagem BCBL1) do HHV-8 e um anticorpo para a proteína Tag do SV40.

O LANA-1 é o antígeno protéico mais expresso em infecções latentes, codificado pela região de abertura ORF73 (do inglês, *open reading frame 73*) do genoma de HHV8. Tem capacidade de interagir com proteínas regulatórias do ciclo celular (pRb) e habilidade de mimetizar a função de p53. Foi descrito em infecção latente com múltiplas cópias extra-

cromossômicas (epissomos), e replicação e manutenção do genoma viral na célula hospedeira (BALLESTAS e KAYE 2011).

A hibridização *in situ* é um método eficiente para detectar material genético viral. Para o EBV dispomos de uma sonda de oligonucleotídeos sintética, EBER, dirigida contra os pequenos RNA que existem em grande número no núcleo das células latentemente infectadas (10^7 cópias). Para o HHV8, existe disponível comercialmente um coquetel de sondas dirigidas para a marcação do RNA mensageiro viral T1.1 que se acumula no núcleo das células infectadas com um grande número de cópias (ZHONG et al. 1996; TUMWINE et al. 2010).

Dados demonstram que a relação do vírus da hepatite C (HCV) apresentam um risco relativo 2 a 14 vezes maior de LNH de células B em pacientes portadores desse vírus (EKSTRÖM-SMEDBY 2006). Em estudo nacional, essa associação também é descrita por CHINDAMO et al. (2002). Ademais, o vírus B da hepatite (HBV) e a coinfeção de HIV e HCV têm sido relacionados como fator de risco para o desenvolvimento de LNH. Os mecanismos pelos quais isto ocorre ainda não são claros (ALTER 2006; JEONG 2010). A coinfeção com HIV, EBV e HHV8 pode servir de potencialização na patogênese de malignidades humanas (RICHIARDI et al. 2010; DA SILVA SR 2011; TAYLOR e BLACKBOURN 2011).

A infecção de HIV em linfoma é reconhecida, sobrepondo-se pelo aspecto epidemiológico aos vírus da hepatite e, como exposto, presente em coinfeção a outros vírus linfotrópicos incluídos nessa pesquisa. Atualmente é intensificada a compreensão sobre a escolha de regimes quimioterápicos

e uso combinado aos antiretrovirais em pacientes com linfomas. Esses estudos possibilitam estratificar fatores de risco e correlacionar a redução de prevalência viral com estudos populacionais (ULRICKSON et al. 2012). A presença da infecção de HIV em pacientes com linfomas ou coinfectados aos vírus EBV, HHV8 ou SV40 foram incluídos no estudo, a partir de informações contidas nos arquivos médicos.

1.3.1 Herpesvirus Humanos

O vírus de Epstein-Barr (EBV), ou Herpesvírus Humano-4 (HHV-4), e o HHV-8 pertencem à família *Herpesviridae*, que é subclassificada em alfa, beta e gama, de acordo com seus hospedeiros, alterações citológicas que provocam e estrutura molecular. Essa classificação foi proposta por um comitê internacional de taxonomia viral, utilizando-se critérios moleculares e de propriedades biológicas (EDELMAN 2005).

O herpesvírus típico consiste de quatro componentes: 1) um envelope com projeções na superfície; 2) um tegumento entre o envelope e o nucleocapsídeo, consistindo de material amorfo; 3) um nucleocapsídeo icosaédrico com 100 nm de diâmetro com 162 capsômeros e um “núcleo” (*core*) que consiste de material fibrilar onde o DNA se ancora; 4) o genoma que consiste de uma molécula de DNA de dupla fita, com 120 a 230 kbp (quilobases em pares) (LEVINE e ABLASH 1999).

Os herpesvírus alfa é de interesse para o estudo das doenças humanas. Inclue-se os herpes simples 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2) e o vírus da varicela-zóster (HHV-3). Membros deste grupo geralmente têm ciclo

reprodutivo curto, disseminação rápida em culturas de células, eficiência na destruição de células em curto período de tempo e são capazes de estabelecer latência em gânglios sensoriais.

O herpesvírus beta distingue-se morfológicamente dos demais por possuir tegumento pronunciado. Inclui-se o HHV-5 (citomegalovírus), o HHV-6, e o HHV-7. Os tipos HHV-6 e 7 infectam linfócitos T (principalmente CD4+), bem como monócitos e macrófagos. Acredita-se que estejam disseminados na população (>85% de indivíduos infectados), causando mais comumente roséola ou exantema súbito. O tipo 7 foi também associado a doenças febris da infância (LEVINE e ABLASH 1999).

QUADRELLI et al. (2011) em estudo revisional, mencionam que EBV e o HHV8 pertencentes à família de γ -herpesvírus são reconhecidos em associação a linfomas de células B e desordens linfoproliferativas atípicas, como em infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). O HHV6 (β -herpesvirus) não tem sido implicado a linfomas malignos, mas a doenças linfoproliferativas (Rosai Dorfman). O citomegalovírus (HCMV) da mesma família não tem sido relacionado a câncer mas a linfocitose (CD4+).

NICHOLAS (2000) demonstra em estudo revisional a possível relação da diversidade biológica e propriedade patogênica/oncogênica das subfamílias de herpesvírus como dependente da adaptação e evolução viral.

- **Epstein Barr Virus (EBV)**

O EBV é um herpesvírus que possui um capsídeo icosaédrico, contendo um genoma de DNA de dupla hélice linear, de 171 kb. Tem uma

distribuição ampla na população mundial, existindo evidências de que mais de 90% dos adultos já tiveram contato com o vírus (GULLEY e RAAB-TRAUB 1993). É transmitido pela saliva, replicando-se inicialmente no epitélio da orofaringe, de forma primária.

Na maior parte dos casos, a infecção permanece assintomática, principalmente em crianças, mas pode originar a mononucleose infecciosa. A infecção persistente de EBV pode estar presente na camada basal epitelial que determinaria o risco da doença. A inconstância de sua presença epitelioide, mas em linfócitos B sugere origem primária da infecção em tonsilas (FAULKNER et al. 2000). Neste caso, os linfonodos estão aumentados e, se for realizada biópsia, o quadro histológico é de uma proliferação linfóide exuberante, que pode ser confundida com linfoma.

A infecção de EBV associada às células epiteliais e mesenquimais pode ser estudada não somente para o entendimento das vias de entrada do vírus no hospedeiro, como também ao grau de relevância na tumorigênese em neoplasias. Nesse caso, é observável maior relação aos tecidos linfóides e epiteliais (DEYRUP 2008).

Historicamente, esse vírus foi descoberto por Anthony Epstein e colaboradores a partir de estudos com células B de Linfoma de Burkitt, por volta do final da década de cinquenta. A descoberta inicial foi feita a partir de casos de crianças com esse tumor na África equatorial, em região de endemia da malária. Estudos futuros mostraram ainda a relação endêmica desse linfoma na África com epissemos de EBV (98%), sendo essa

associação menos frequente nos casos de Burkitt esporádico dos países industrializados (15-20%) (BOCCARDO e VILLA 2004).

O EBV pode ser encontrado na fase lítica ou latente. A fase lítica corresponde à infecção produtiva, caracterizada pela expressão de enzimas virais envolvidas no processo de replicação do DNA viral e de proteínas que formarão os novos capsídeos. As células hospedeiras são lisadas e novas partículas virais infectam outras células ou são eliminadas na saliva, disseminando a infecção na população. Além de células epiteliais, células linfóides B quiescentes são infectadas pelo EBV (LI et al. 1992), por meio da adsorção do vírus à molécula CD21 (receptor de complemento na superfície de células B, ou CR2) a ligação é estabelecida por uma glicoproteína gp350/220 do envelope viral (SPEAR e LONGNECKER 2003)

No núcleo da célula hospedeira, o DNA viral é circularizado formando um episomo. As células B são impedidas de entrar em apoptose e levadas a entrar no ciclo celular (DEYRUP 2008). A maior parte das células B infectadas é destruída pelos linfócitos T citotóxicos, mas uma subpopulação permanece imortalizada, contendo a forma latente do vírus. Estas células estariam protegidas da ação dos linfócitos T citotóxicos, provavelmente, por terem baixa expressão antigênica e por encontrar-se em estado latente.

Esse fato poderia justificar a maior frequência de linfomas B associados ao EBV em imunossuprimidos ou imunocomprometidos transplantados, em pacientes com certos defeitos genéticos (como a agamaglobulinemia ligada ao cromossomo X, XLA). Estes processos linfoproliferativos incluem o linfoma de Burkitt, o de grandes células B com

diferenciação plasmocitóide- imunoblástica, linfoproliferações policlonais, linfoma de Hodgkin (FAULKNER et al. 2000; CARBONE et al. 2008a, b), linfoma angioimunoblástico ou linfoma de células T/NK extranodal nasal, além de outros raros tipos de linfomas (ANAGNOSTOPOULOS et al. 1992; WEISS et al. 1992; QUINTANILLA-MARTINEZ et al. 1998; CARBONE et al. 2008b).

Os linfócitos B quiescentes apresentam a forma latente de EBV, tipo I, II e III as quais expressam diferentes produtos gênicos. O tipo I é observado em células não-proliferativas da linhagem B, com expressão do antígeno nuclear do EBV (EBNA1) e dos RNA mensageiros EBER-1 e EBER-2. A proteína EBNA1 é considerada mantenedora do genoma viral, implicada na replicação do DNA viral, na regulação transcricional de outras proteínas latentes e de membrana e não é reconhecida pelas células T citotóxicas. Os EBERs podem interagir com proteínas intracelulares, com ação na inibição de apoptose (IFN- α e γ), citocinas (IL-10) e formando complexos com NF κ -B. Parecem ser importantes na progressão do linfoma modulando atividades de sinalização do sistema imune e da persistência viral (IWAKIRI e TAKADA 2010; SAHA e ROBERTSON 2011) O linfoma de Burkitt apresenta este tipo de latência do EBV (AMBINDER e WEISS 1999; DEYRUP 2008).

O tipo II, é dividido em IIa e IIb e caracteriza-se pela expressão de EBNA1, EBERs e LMP1 e LMP2. A LMP1 é uma proteína de membrana que inibe a apoptose da célula hospedeira pela estimulação da produção de NF κ B e Bcl2. A LMP2 é uma proteína de membrana que impede que células infectadas pelo vírus entrem no ciclo lítico, inibindo o receptor de células B e

mimetizando-o na sinalização de sobrevivência dos linfócitos B. Este tipo de latência é encontrado no linfoma de Hodgkin clássico, linfoma T/NK nasal e linfoma B primário das cavidades serosas.

A latência tipo III caracteriza-se pela expressão das proteínas e EBERs acima, além dos EBNA-2 e EBNA-3. O primeiro regula e ativa genes celulares e virais, como os LMPs; pode ainda induzir a proliferação celular por indução do c-Myc. O EBNA-3 parece desempenhar um papel na alteração do processo de *homing* e na transformação dos linfócitos B. Este tipo de latência é encontrado na linfoproliferação pós-transplante, nos linfomas relacionados ao pítórax, na granulomatose linfomatóide, linfoproliferações do idoso e no linfoma primário do sistema nervoso central. Foram descritas homologias entre os antígenos EBNA-1 e 2 e o ORF73 do HHV-8 (LANA) (NICHOLAS 2000).

A desregulação de genes de vias de sinalização celular, incluindo citocinas, quimiocinas, receptores de morte (apoptose) e fatores transcricionais têm sido implicados ao LMP1. Entre eles NF- κ B (fator de transcrição nuclear), de necrose (TNF) e interações intracelulares Notch1. Outras vias envolvem timocitos Th2 e T e perda de função Th1, CD8/células citotóxicas e NK/T, modulando respostas inflamatórias e escape do sistema imune (POPPEMA 2005).

NICHOLAS (2000) relata ainda, o papel da LMP-1 e K1/HHV-8 com as vias de sinalização celular de proliferação, por meio de mecanismos básicos de transduccionais, associados ao fator de necrose tumoral (TNF) e receptores (TRAFs), como o de morte celular (TRADD). O LMP-1 simula o

efeito de um receptor de crescimento ativado e seu domínio intracelular interage com fatores associados aos TRAFs e TRADD.

Na raiz da patogênese do LH associado ao EBV estão os mecanismos de sobrevivência e escape do sistema imune e apoptose pelas células de *Reed Sternberg* (RS) (D'SOUZA et al. 2004; VOCKERODT et al. 2008). Estas têm sua sobrevivência mantida, apesar das alterações fenotípicas e de defeitos nos rearranjos gênicos das imunoglobulinas (KÜPPERS 2009; FARRELL e JARRETT 2011). Além disto, as células alteradas escapam à vigilância do sistema imune de células T citotóxicas (CTL), (LAICHALK et al. 2002).

Os EBERs estão presentes em grande quantidade nas células infectadas latentemente (10^7 cópias por célula), permitindo seu uso para detecção da infecção viral por hibridização *in situ* (HIS) (AMBINDER e WEISS 1999). Com isto, estudos nacionais e de outros países têm demonstrado a presença do EBV em alta frequência nos LH pediátricos e indivíduos HIV-positivos (próximas de 100%) e frequência mais alta de EBV nos LH de adultos em países em desenvolvimento, em relação aos industrializados (EVANS e GUTENSOHN 1984; PALLESEN et al. 1991; VASSALLO et al. 1993; PAES et al. 1996; ANAGNOSTOPOULOS e HUMMEL 1996; BACCHI et al. 1996a; ABREU et al. 1997; VASSALLO et al. 2002; ELGUI de OLIVEIRA et al. 2002; HJALGRIM et al. 2003; MOHAMMED et al. 2005; BARROS et al. 2010).

Em relação aos linfomas de Burkitt, pacientes da Bahia mostraram reatividade em 87% dos casos (ARAUJO et al. 2008). No mesmo país, há

diferenças entre regiões, que vão de 60-70% (BACCHI et al. 1996b, ARAUJO et al. 2006, PIZZA et al. 2008).

Pacientes com linfomas de origem de células B periféricas têm sido associados a diferentes fatores de riscos (idade, sítios específicos tumorais, virais) promovendo conhecimentos da linfomagênese e transformação neoplásica, com melhora nos tratamentos terapêuticos (JAFFE 2009). Assim, entendimentos de mecanismos e de moléculas virais com papel na transformação e manutenção do fenótipo maligno promovem estudos de importância clínica, prognóstico, sobrevida e respostas terapêuticas (CARBONE et al. 2011; SAHA e ROBERTSON 2011).

O impacto de EBV no prognóstico da doença pode ter papel desfavorável na resposta terapêutica e sobrevida, como em desordens linfoproliferativas, em pacientes com idade mais avançada (OYAMA et al. 2007) ou em linfomas B periféricos (LDGCB) ao índices de prognósticos menos favoráveis e sobrevida desses pacientes (SHIMOYAMA et al. 2009).

- **Herpesvirus Humano Tipo 8 (HHV-8)**

O HHV-8 tem sido implicado a infecções líticas de células epiteliais e fibroblastos, e células linfoblastóides, com especificidade das subfamílias virais à sua presença em linhagem B (EDELMAN 2005) ou T, conforme observado em estudo com linfoma de efusão primária de células T (COUPLAND et al. 2005), embora o genótipo maligno mais comum seja para células B.

O herpesvírus do tipo 8 é associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV). Em 1994, foi identificado por técnicas de biologia molecular em tecido proveniente de paciente HIV-positivo acometido pelo sarcoma de Kaposi (CHANG et al. 1994; LEVINE e ABLASH 1999). Bem como o EBV ou HHV-4, com o qual apresenta homologias, trata-se de um vírus do tipo gamma-herpesvírus e está filogeneticamente mais próximo do RRV (do gênero Rhadinovírus), presente na população de macaco Rhesus (MCGEOCH e DAVISON 1999; EDELMAN 2005).

De modo geral, é sabido que a região central da África (GAO et al. 1996), bem como o sul da Europa (PERNA et al. 2000), são regiões que apresentam as maiores incidências de infecção por HHV-8 na população geral. No estudo de GAO et al. (1996), utilizando imunofluorescência, mostrou-se que em Uganda 24/47 (51%) dos indivíduos-controles eram soropositivos para HHV-8, enquanto 4/107 (4%) dos doadores italianos e nenhum dos 122 doadores norte-americanos. Neste estudo, mostrou-se que pacientes portadores de AIDS e sarcoma de Kaposi destes três locais apresentavam soropositividade de 71-81% para o HHV8.

PERNA et al. (2000) estudaram (por imunofluorescência indireta) o soro de 970 indivíduos HIV negativos entre 1 e 70 anos, além de 742 indivíduos com diferentes tipos de risco para infecção pelo HIV. A soroprevalência do HHV-8 foi de 11,5% na população geral, sendo de 6% em indivíduos abaixo dos 16 anos e 22% acima dos 50 anos. Indivíduos de risco para infecção pelo HIV tiveram soroprevalência mais alta para HHV-8. Com isto foi demonstrado que a infecção pelo HHV-8 é relativamente

difundida na Sicília Ocidental, podendo haver uma forma de disseminação sexual, que aumenta com a idade, e uma outra forma (provavelmente contato pessoal) em crianças.

Estudando-se mulheres virgens e monogâmicas na Suécia, Tedeschi e colaboradores encontraram 9% de soropositividade para HHV-8, reforçando a hipótese de uma transmissão não sexual (TEDESCHI et al. 2000). Em outros estudos, conclusões similares foram atingidas (KEDES et al. 1996; BOULANGER 1998). HANNACHI et al. (2011) mencionam em estudos epidemiológicos na região do Centro-Oeste da Tunísia e Mediterrâneo prevalência viral em adultos/crianças de 13,8%, alta em mulheres grávidas (13%) e em crianças (12%), o que torna provável a transmissão pela saliva materna, e aumenta o risco de Sarcoma de Kaposi.

No Brasil, uma população de ameríndios mostrou uma alta prevalência de infecção pelo HHV-8, chegando a 53% dos indivíduos, sendo 41% nas crianças abaixo de 10 anos e 65% em adultos (BIGGAR et al. 2000). Outro estudo realizado com amostras coletadas de sete pacientes do estado de São Paulo acometidos pelo Sarcoma de Kaposi e portadores do HIV, demonstrou a presença do vírus em todos os casos (CATERINO-DE-ARAÚJO 1998). Além disso, utilizando técnica da PCR em biópsias de linfonodos de pacientes HIV negativos encontrou-se positividade em 2/25, também em São Paulo (VASSALLO et al. 2002).

Na faixa etária pediátrica, estudo de MAYAMA et al. (1998) revelam que cerca de 50% de 215 crianças de Uganda são soropositivas para HHV-

8, havendo uma associação antes dos 12 anos de idade com o vírus da hepatite B.

Em estudo de 497 crianças e adultos de Belém, Pará, Brasil, foi encontrado uma prevalência total de 16,3% de indivíduos positivos para o HHV-8, por imunoenensaio no soro (FREITAS et al. 2002). Neste estudo, a prevalência em indivíduos menores de 10 anos foi de 12% e cresceu com a idade, chegando a 33% em maiores de 41 anos. Na pesquisa deste vírus em adenóides e tonsilas palatinas retiradas de crianças em nosso meio, foi demonstrado que 6,8% eram positivos para HHV-8 por meio da técnica de hibridização *in situ* (CHAGAS et al. 2006).

Dos processos patológicos associados ao HHV-8, o sarcoma de Kaposi é o mais bem estudado. Nesta neoplasia, o vírus aparece infectando as células fusiformes típicas deste tumor, além de células endoteliais (BOSHOFF et al. 1995). No entanto, em outros dois processos patológicos o vírus parece ter papel importante em seu estabelecimento e evolução: no linfoma não-Hodgkin das cavidades serosas (BOSHOFF et al. 1995) e na doença de Castleman (SOULIER et al. 1995; DUPIN et al. 2000).

Os mecanismos genéticos, que relacionam o HHV-8 a neoplasias estão baseados na codificação pelo vírus de proteínas homólogas a proteínas do ciclo celular. Uma v-ciclina pode inativar o gene supressor do retinoblastoma (SARID et al. 1999), enquanto uma proteína viral homóloga à proteína bcl-2 (v-bcl2) pode bloquear a apoptose (SARID et al. 1997). Por sua vez, uma v-interleucina-6 induz proliferação de células linfóides B, ativação da angiogênese e inibição da resposta imune de células T “helper”.

Esta v-interleucina-6 tem sido postulada como a responsável pelo desenvolvimento do SK (NICHOLAS et al. 1997).

Estudos usando culturas de células simultaneamente positivas para CD19 e HHV-8, obtidas de material de biópsia de SK, misturadas com culturas de células CD19 positivas normais, demonstraram infecção destas últimas pelo vírus (LEVI 1997). Virtualmente todos os casos de linfomas das cavidades serosas (neoplasia originada de linfócitos B) mostraram-se infectadas pelo HHV-8 (NADOR et al. 1996). Além disso, a doença de *Castleman* multicêntrica está intimamente relacionada com a positividade para HHV-8. É uma doença que apresenta hiperplasia dos folículos linfóides e células B plasmocitóides positivas para o HHV-8 (SOULIER et al. 1995; DUPIN et al. 2000). No Brasil, não é conhecida a relação deste vírus com neoplasias linfóides.

A relação etiológica do vírus HHV-8 às desordens linfoproliferativas não são exclusivas de pacientes HIV positivos (LUPPI e TORELLI 1996), mas nestes a imunossupressão potencializa o risco de se desenvolver o Sarcoma de Kaposi (LEÃO et al. 2002).

1.3.2 Poliomavírus, Vírus Símio 40 (SV40)

O SV40 tem como hospedeiro natural o macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) e sua urina representa um disseminador do agente viral. Em humanos pode induzir infecções persistentes renais, detectado em sangue periférico e outros tecidos como o mesotélio.

A contaminação humana pelo vírus SV40, historicamente, é determinada pela vacina de poliovírus inativado (Salk) e oral atenuado (Sabin) (CARBONE et al. 1997), originada dos Estados Unidos da América. Contaminou milhões de pessoas no período entre 1955-1963 (POULIN e DECAPRIO 2006), disseminando-se na década de 60 para outros países, como: União das Repúblicas Socialistas Soviéticas, Japão, Inglaterra, Itália e México (STRICKLER et al. 2003). Mas, no presente, a prevalência da infecção viral é incerta em humanos e mais evidente em primatas e roedores (VILCHEZ e BUTEL 2003; 2004).

O SV40 é um vírus de DNA de dupla hélice (5,243 pb) pertencente ao gênero *Poliomaviridae*. O genoma viral codifica três proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3); duas com papel do ciclo de vida viral (pequeno t e grande T antígeno; Tag e TAg, respectivamente) e duas pequenas proteínas, com função desconhecida. Este gênero compreende dois outros vírus, JCV e BKV, que infectam humanos, têm potencial oncogênico e estão relacionados à patogênese da leucoencefalopatia multifocal e à cistite hemorrágica, respectivamente (POULIN e DECAPRIO 2006; LOWE et al. 2007).

A disseminação viral é dependente da inserção do genoma viral à maquinaria de replicação genética de seu hospedeiro, ligando-se as regiões de origens de replicação do DNA (ORI), recrutando enzimas como DNA polimerase. Ainda, deve-se ocorrer a transcrição de componentes estruturais e funcionais do vírus, como os capsídeos, e para isso é descrito a importância das regiões Tags (LOWE et al. 2007).

O efeito oncogênico do SV40 parece estar relacionado com a sua proteína Tag, que além de ter papel na replicação viral, desregula a proliferação de células infectadas. Acredita-se que a Tag se ligue ao gene do Rb do hospedeiro, abolindo sua atividade e resultando na progressão do ciclo celular para a fase S. Ademais, a Tag parece reprimir a ação da proteína p53. A detecção da seqüência Tag pode ser significativa (64%) em linfomas de células B, com maior frequência para células B de centro germinativo com SV40 positivos (MENESES et al. 2005).

O estudo oncogênico de SV40 tem sido realizado a partir de pesquisas *in vivo* e *in vitro*, sugerindo a ação patogênica em roedores com semelhantes seqüências gênicas regulatórias detectadas em tumores humanos (mesotelioma). A expressão destes genes parece relacionar-se com transformação em linhagens de astrócitos e de mesoteliomas, utilizando-se vias intracelulares Notch1 e c-Met (ZHANG et al. 2010). O potencial oncogênico parece ter forte associação com a mutação de p53 em pacientes infantis (n=91) com linfomas B periférico e precursor (66% SV40+), (HEINSOHN et al. 2011). Em linfomas humanos, os tipos de LNH têm mostrado incidência de SV40 para os de origem de células B (folicular e difuso de grandes células B). E, com menor representatividade, em linfomas do tipo T e em LH (SHIVAPURKAR et al. 2002). Sendo presente em outros tipos de neoplasias, como os de origem de SNC (SEBATIER et al. 2005).

A incapacidade de precisão para identificação de indivíduos infectados e das vias de transmissão têm dificultado estudos epidemiológicos que permita avaliar os riscos ao desenvolvimento de

doenças associados ao SV40. Estudos denotam a importância da sua epidemiologia para o entendimento da neoplasia maligna, como o mesotelioma, ao lado da exposição química, como asbestos, ou física, e a radiação ionizante (BOFFETTA 2007).

Outros estudos referem uma inconsistência da relação entre a contaminação de pacientes pela vacina poliovírus contendo SV40 com o diagnóstico de mesotelioma (STRICKLER et al. 2003). Em relação aos linfomas malignos, associa-se com neoplasias linfóides de indivíduos infectados pelo HIV ou em pacientes imunossuprimidos com linfoproliferações pós-transplante (VILCHEZ et al. 2005; 2006).

O estudo de SV40 e EBV em linfomas humanos (n= 171) de pacientes originados do Texas (USA) revelou diferenças na distribuição demográfica de SV40. Uma população teve maior frequência de SV40 (10/44; 23%) enquanto outra apenas 3% (4/127; $p < 0.0001$), com grupos EBV positivos (39% vs 18%, $p = 0.01$). O SV40 foi mais frequente em indivíduos mais jovens e os resultados dependeram da qualidade e quantidade de DNA disponível nos tecidos parafinados, o que levou a diferenças de detecção viral por PCR e imunistoquímica (BROUSSET et al. 2004; TORACCHIO et al. 2009).

Em países não-industrializados, a relação deste vírus com linfomas B de pacientes imunocompetentes também foi relatada (MENESES et al. 2005). No entanto, em outros relatos sobre linfomas de países industrializados, tal relação foi negada (SHAH 2007). Desta forma, a

inexistência de dados sobre pacientes brasileiros, justifica a proposta de se avaliar a relação deste vírus com neoplasias linfóides.

A patogênese dessa doença é bem investigada por meio de modelos experimentais para a comprovação de uma relação causal entre o SV40 e neoplasias. Por exemplo, é proposto que o asbestos e o SV40 em células mesoteliais *in vitro* parecem co-participar na transformação maligna (CARBONE et al. 2002) e o SV40 pode interferir na imortalização celular por meio da ação sobre a atividade da telomerase (FODDIS et al. 2002).

Como propostas de testes para detecção viral SV40 seguem-se os princípios descritos para outros grupos. Entre eles, a imunistoquímica e a PCR, como visto em estudos de pacientes com LNH originados da região de Costa Rica, América Central (MENESES et al. 2005) e em diferentes neoplasias (POULIN e DECAPRIO 2006).

Outra sugestão, formulada por um grupo de pesquisadores japoneses é a demonstração de frequência de SV40 em linfoma difuso de grandes células B a partir de hibridização *in situ*, aliada à PCR (NAKATSUKA et al. 2003). No entanto, a reação por PCR nem sempre é efetiva, possivelmente por insuficiência de cópias de DNA viral presentes na amostra ou artefactual, conforme já descrito em estudo visando a pesquisa de SV40 em mesoteliomas (KLEIN et al. 2002).

Sugestões adicionais para obtenção de um consenso sobre a melhor metodologia de estudo na detecção de SV40 foram feitas por SHAH (2007). SEBATIER et al. (2005) completa a idéia quando da discussão sobre a identificação de sequências Tags do SV40 em tumores derivados do sistema

nervoso central. Mostra as dificuldades quanto ao estabelecimento dos controles positivo e negativo e devidas ao tipo de fixador utilizado.

Assim, nosso estudo pretendeu considerar a importância desses vírus na patogênese de linfomas, contribuindo com informações sobre a presença dos mesmos em nosso meio e na viabilidade de utilização dos marcadores nos tecidos disponíveis, ou seja, os tecidos arquivados. Embora estudos prospectivos possam ser feitos, a frequência de 10% de linfomas dentre as neoplasias malignas permitiria estudo de apenas um número muito reduzido de casos (VASSALLO et al. 2002).

Dada a existência de relativamente escassos estudos relacionados aos vírus oncogênicos dentre as neoplasias linfóides em nosso meio, na maior parte referente ao EBV em linfomas de Hodgkin e Burkitt, mesmo assim com pequeno número de casos, e à riqueza de material de arquivo disponível em nosso Estado, propusemos o presente projeto, com o intuito de aprofundar o conhecimento do papel dos vírus EBV, HHV8 e SV40 nos linfomas malignos de nosso meio. Além de ampliar a avaliação do EBV em linfomas de Hodgkin e Burkitt, buscamos detectar esse vírus em outros tipos de linfomas não Hodgkin, para detectar outros tipos recentemente descritos, como o linfoma de grandes células B associado ao EBV do idoso. Ademais, não há em nosso meio, estudo que tenha buscado HHV8 e SV40 em linfomas malignos.

Para isso, aproveitamo-nos da praticidade da técnica [*do inglês*] *Tissue Microarrays* (TMA) devido à possibilidade de estudo de um grande

número de casos (CATALANO e ILAND 2005) com dispêndio de relativamente pouca quantidade de reagentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar criticamente as correlações entre a expressão imunohistoquímica e por hibridização *in situ* dos vírus oncogênicos: EBV, HHV-8 e SV40, em linfomas malignos com dados clínicos, demográficos e temporais dos pacientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência de expressão dos vírus oncogênicos: EBV, HHV-8 e SV40, em linfomas malignos diagnosticados em 5 grandes instituições do Estado de São Paulo: Hospital A C Camargo, Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas e Hospital do Câncer de Barretos, cujos tecidos constam dos respectivos arquivos de Patologia;
- Correlacionar a expressão dos vírus com dados demográficos e clínicos dos pacientes: procedência, idade, gênero, etnia, estágio, e dados de sobrevivência;
- Correlacionar a expressão dos vírus com dados patológicos de tipos tumorais;

- Correlacionar a expressão dos vírus com dados temporais (período de diagnóstico), buscando avaliar a existência de uma mudança de padrão no perfil de positividade reconhecido nas diversas neoplasias.

3 METODOLOGIA

3.1 PACIENTES

O estudo foi retrospectivo, incluindo os casos dos anos de 1954 a 2008 diagnosticados como linfomas malignos e cinco instituições do estado de São Paulo: Hospital A C Camargo de São Paulo (HCACC), Hospital de Câncer de Barretos/ Fundação Pio XII (HCB), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (HCUNICAMP), Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (HISCMSP). A identificação dos colaboradores do projeto, características históricas e de atendimento dos 5 serviços hospitalares, se encontram no **Anexo 1**. E, entre as características do tipo de atendimento que merecem atenção em nosso estudo, destaca-se: no hospital A C Camargo e HCUNICAMP o atendimento pediátrico foi interrompido a partir de 1990, pois os serviços de Hematologia Infantil foram para centros especializados. Os demais centros continuaram a atender as demandas de todas as faixas etárias.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com diagnóstico de linfoma maligno (Hodgkin e não-Hodgkin) 1954-2008 foram selecionados nas cinco instituições.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Para o estudo de reclassificação histológica e pesquisa dos vírus linfotrópicos, foram excluídos os casos em que os blocos de parafina não estavam disponíveis ou não eram suficientes para as análises laboratoriais propostas. Dos casos com tecido arquivado, foram excluídos das análises clínicas específicas aqueles em que os prontuários não apresentavam informações adequadas para levantamento dos dados necessários à correlação clínica e patológica. O total de casos obtidos para linfoma não Hodgkin e de Hodgkin, por instituição, está resumido nas **Tabelas 1 e 2**.

Apenas no Hospital A C Camargo foi viável estudar casos anteriores ao ano de 1980, devido à maior acessibilidade de seus arquivos de Patologia.

Tabela 1 Número de casos elegíveis por período de diagnóstico e instituição: linfomas de Hodgkin e Não Hodgkin.

	P1	P2	P3	N.Caso Inicial	N.Caso Excluído	Total
HCACC	324	468	377	1221	52	1169
HCB	0	40	260	507	207	300
HCFMUSP		237	230	500	33	467
HCUNICAMP	0	0	220	390	170	220
HISCMSP	0	297	240	570	33	537
Totais	324	1042	1327	3188	495	2693

Siglas: Hospital A C Camargo de São Paulo (**HCACC**), Hospital do Câncer de Barretos/Fundação Pio XII (**HCB**), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**HCFMUSP**), Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (**HCUNICAMP**), Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (**HISCMSP**); **P1**=1954-1979; **P2**=1980-1999; **P3**=2000-2008.

Tabela 2 Número de casos elegíveis por instituição, períodos de diagnóstico, tipos histológicos.

	P1 LNH/LH	P2 LNH/LH	P3 LNH/LH	Total LNH	Total LH	Total Final
HCACC	193/131	370/98	277/100	840	329	1169
HCB	0	28/12	158/102	186	114	300
HCFMUSP	0	166/71	137/93	303	164	467
HCUNICAMP	0	0	169/51	169	51	220
HISCMSP	0	130/167	176/64	306	231	537
Totais	193/131	694/348	917/410	1804	889	2693

Siglas: Hospital A C Camargo de São Paulo (**HCACC**), Hospital do Câncer de Barretos/Fundação Pio XII (**HCB**), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**HCFMUSP**), Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (**HCUNICAMP**), Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (**HISCMSP**); **P1**=1954-1979; **P2**=1980-1999; **P3**=2000-2008; **LNH**=Linfoma não Hodgkin; **LH**=Linfoma de Hodgkin.

Todos os casos foram revistos para confirmação e atualização diagnóstica e áreas selecionadas para construção do microarranjo de tecido (*tissue microarray*, TMA). Os casos com estudo imunistoquímico prévio foram revistos com os preparados originais. Dos casos sem estudo imunistoquímico, ou com estudo incompleto, este foi realizado segundo os

painéis do **Apêndice 1**. Ao final da seleção, obtivemos 2693 pacientes diagnosticados com linfoma, sendo 889 com diagnóstico de LH e 1804 casos de LNH, reclassificados segundo a OMS (2008), citado por JAFFE et al. (2008) e ZERBINI et al. (2011).

3.4 ÉTICA

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A C Camargo/ Fundação Antonio Prudente, como instituição central do estudo (parecer 1120/08, **Anexo 1**). Nas demais instituições, os respectivos Comitês de Ética aprovaram a participação no estudo (**Anexo 1**).

3.5 AMOSTRAS

Das amostras tumorais obtidas dos tecidos parafinados, dois cilindros de 1 mm de diâmetro cada foram incluídos em blocos do TMA. Este foi preparado em um aparelho fabricado pela *Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA*, de propriedade do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo de São Paulo. Os cortes resultantes dos TMAs tiveram espessura de 5 micrômetros e foram colocados sobre lâminas com adesivo (Starfrost®) e submetidas à fixação por ultravioleta em aparelho fabricado pela *Instrumedics Inc®*, Hackensack, NJ, EUA. Posteriormente, as lâminas sofreram um banho de parafina e

foram armazenadas a vácuo em freezer a -20°C , até o momento do uso para as reações imunistoquímicas e de hibridização *in situ*.

3.6 IMUNOISTOQUIMICA

Os cortes de TMAs foram desparafinados primeiramente por 24 horas em estufa 60°C ; posteriormente as lâminas foram banhadas em xilol a 60°C por 20 minutos, xilol à temperatura ambiente por 20 minutos, etanol 100% por 30 segundos, etanol 85% por 30 segundos e etanol 70% por 30 segundos. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Para recuperação antigênica, fervemos a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 ou tampão Tris-EDTA pH 9.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada, mergulhamos as lâminas e lacramos a panela com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, abaixamos a válvula de segurança e aguardamos a pressurização total. Cronometramos 4 minutos após esse sinal. Deixamos a panela fechada sob água corrente até a despressurização total. Destampamos a panela com as lâminas e lavamos em água corrente e destilada.

Procedemos ao bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3%, (água oxigenada 10 vol) com 3 trocas de 10 minutos cada. Lavamos em água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-*phosphate buffered saline*) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

Incubamos as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme listagem a seguir, em tampão PBS contendo

albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Para classificação dos linfomas foram utilizados marcadores fornecidos pela Dako, Carpinteria, CA, USA: CD2 (dilição 1:100), CD3 (1:100), CD5 (1:100), CD7 (1:50), CD10 (1:100), CD15 (1:100), CD20/L26 (1:100), CD 21 (1:100), CD23 (1:100), CD30/Ber-H2 (1:50), CD43 (1:100), CD56 (1:100), CD138 (1:100), CD246/ALK-1 (1:100), Bcl2 (1:100), Bcl-6 (1:100), Ciclina D1/SP4 (1:50); Ki-67/MIB1 (1:50), antígeno epitelial de membrana (EMA; 1:500); Kappa (1:300), Lambda (1:300), mieloperoxidase (1:10.000), MUM-1 (1:100), Pax-5 (1:50), perforina (1:100) e TdT (deoxinucleotidil transferase terminal; 1:100).

Para pesquisa dos agentes virais, foram utilizados anticorpos para: LMP1/EBV (clone CS1-2, Dako, 1:200), HIV/p24 (1:100; Dako), HHV8/LNA-1 (clone LN35, 1:100, BioSB, Santa Barbara, CA, USA) e SV40/Tag (1:100, Cell Marque, Rocklin, CA, EUA). Imagens de tecidos com detecção viral podem ser vistas nas **Figuras 3 a 5** e informações adicionais para padronização do método, descrito por CHAGAS et al. (2006) e VASSALLO (2001), para detecção dos herpesvírus EBV e HHV8 e poliomavírus SV40, por SEBATIER et al. (2005). Detalhamento do método de estudo pode ser consultada no **Anexo 2**.

Retiramos o excesso de anticorpo primário e lavamos as lâminas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Incubamos por 30 min a 37° C com o sistema de detecção *Advance™ HRP Link* (Dako, cód. # K4068). Lavamos com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada. Incubamos com o *Advance™ HRP Enzyme* por 30 min a 37° C. Lavamos em tampão PBS com

3 trocas de 3 minutos cada. Incubamos as lâminas em solução substrato: 100mg de 3,3' tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB; Sigma, cód. D-5637, St Louis, MO, EUA), 1mL de dimetilsulfóxido, 1 mL de H₂O₂ a 6% (água oxigenada 20 vol), 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Lavamos em água corrente e água destilada por 3 minutos. Contracoramos com hematoxilina de Harris por 1 minuto. Lavamos bem em água corrente e destilada. Imergimos 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada. Desidratamos as lâminas em: etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% por 2 vezes de 30 segundos cada e xilol por 4 vezes de 30 segundos cada. Montamos as lâminas em *Entellan-neu* (Merck, cód. 1.07961, Darmstadt, Alemanha). Observamos ao microscópio como produto final da reação o desenvolvimento de precipitado castanho dourado em grânulos citoplasmáticos, membrana celular ou núcleo, variável ao tipo de marcador. O caso foi avaliado como positivo ou negativo, a depender do padrão de reatividade, sem considerar percentual de células coradas.

3.7 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

As reações de hibridização *in situ* para detecção viral foram realizadas, segundo a orientação dos fabricantes. Foram utilizadas as sondas para: 1) vírus de Epstein-Barr/ EBER (Novocastra *Laboratories*, *Newcastle*, Reino Unido), 2) HHV8/LNA-1 (Novocastra) e 3) Poliomavirus (SV40, JCV, BKV) sondas Tag, provenientes da *Enzo Life Science PRO*,

(*Farmingdale*, NY,USA). Foram considerados positivos apenas casos com células tumorais com sinal nuclear de marcação. Imagens de tecidos com detecção viral podem ser vistas nas **Figura 3 a 5**. Informações adicionais para padronização do método foram utilizadas segundo descrições feitas por CHAGAS et al. (2006) e VASSALLO (2001); para detecção dos herpesvírus EBV e HHV8; e poliomavírus SV40, BKV e JCV por WÜTHRICH et al. (2006); TAN et al. (2010). Detalhamento do método de estudo pode ser consultada no **Anexo 2**.

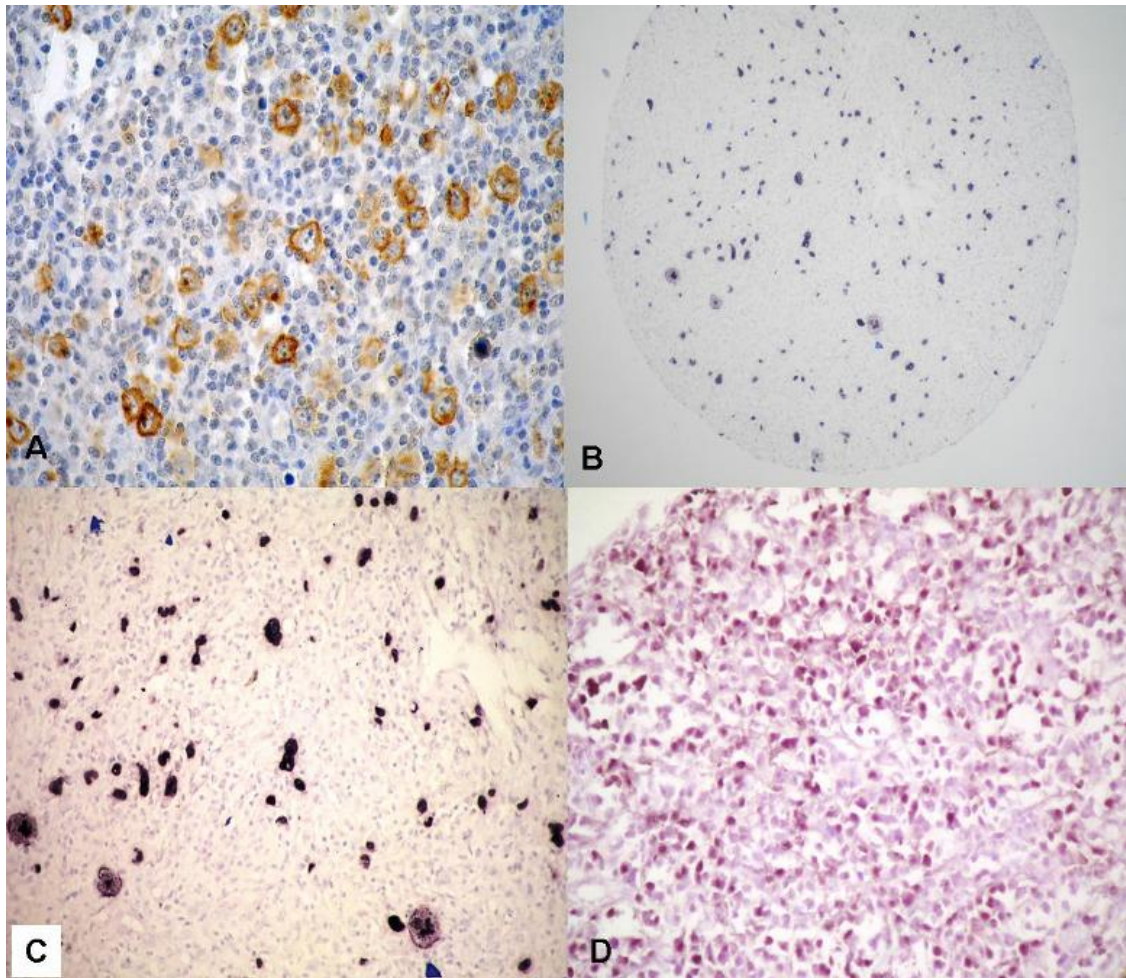


Figura 3 - Reações para o vírus de Epstein-Barr (EBV). A= Linfoma de Hodgkin clássico, cujas células neoplásicas são positivas para a proteína latente de membrana 1 (LMP1) do EBV em padrão citoplasmático; imunohistoquímica, 400x. B e C= Hibridização in situ com a sonda EBER, em padrão nuclear (B= 100x, C= 400x). D= Linfoma não-Hodgkin expressando EBER (hibridização in situ, 400x).

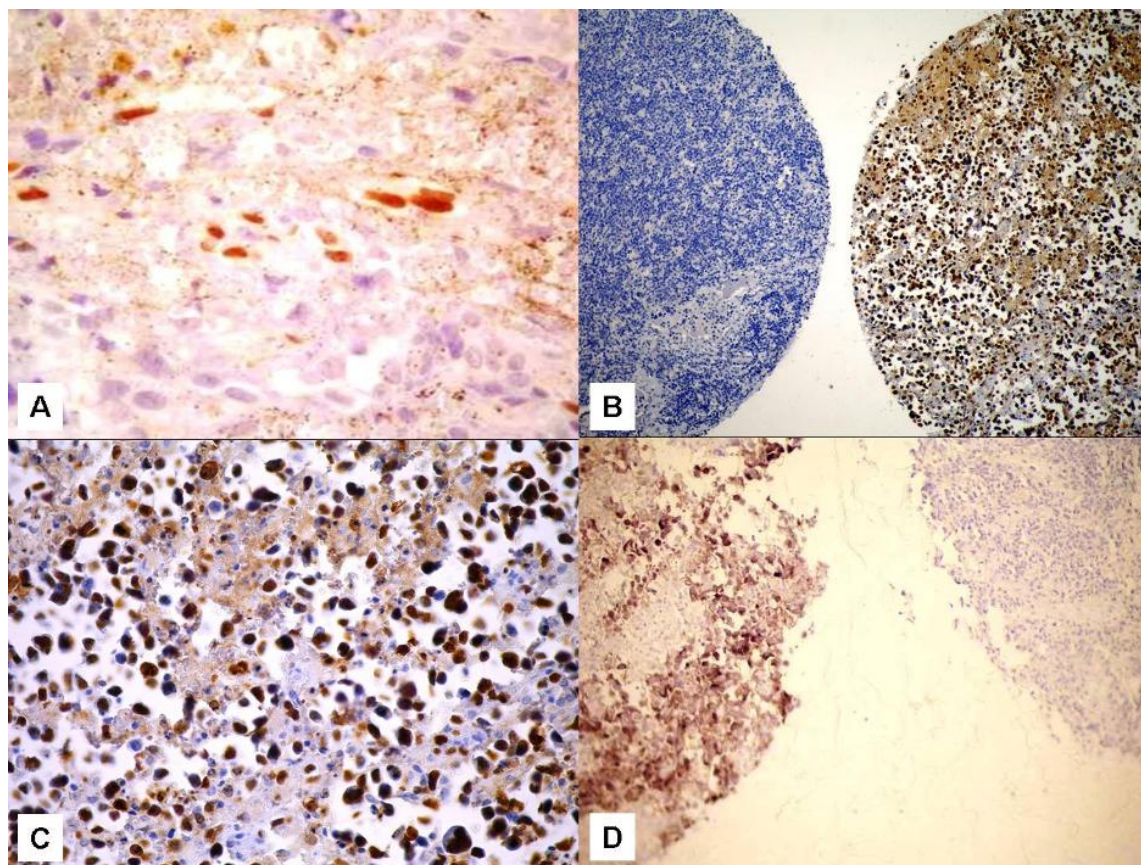


Figura 4 - Reações para o herpesvirus humano tipo 8 (HHV8). A= controle positivo representado por sarcoma de Kaposi, mostrando padrão nuclear (imunohistoquímica LNA1, 600x). B e C= Linfoma não-Hodgkin expressando o HHV8 nuclear (imunohistoquímica, B= 100x, C= 400x). D= Reatividade nuclear focal para HHV8 por hibridização in situ (sonda T1.1) em um caso de linfoma não-Hodgkin (100x).

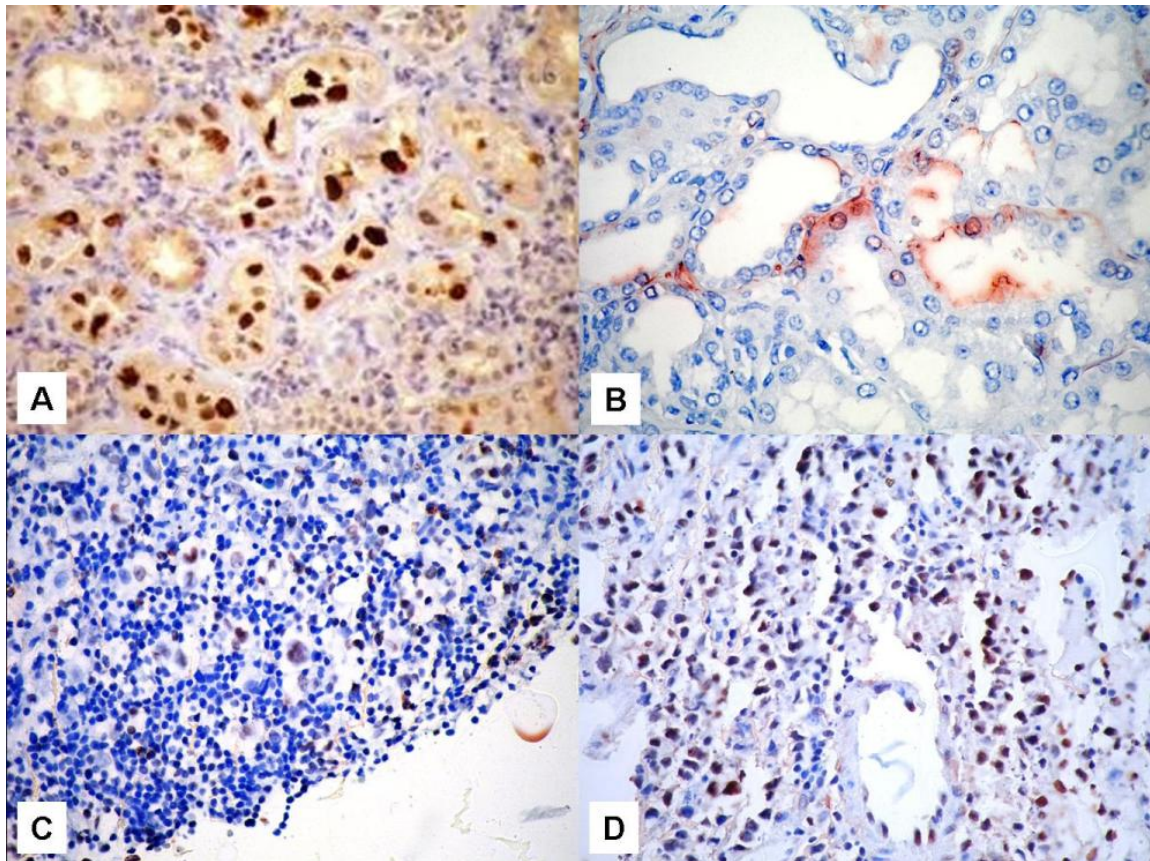


Figura 5 - Reações para vírus símio 40 (SV40). A= reatividade nuclear por imunohistoquímica em um controle positivo, representado por rim de macaco infectado (400x). Uma vez que não houve reatividade por esta técnica em nenhum caso de linfoma, utilizamos também a hibridização in situ (sonda Tag). B= mesmo controle positivo referido em A, com reatividade nuclear fraca por hibridização in situ (400x). Linfoma de Hodgkin clássico (C) e linfoma não-Hodgkin (D) mostrando fraca expressão de Tag no núcleo de células neoplásicas (hibridização in situ, 400x).

3.8 ESTUDO CLINICOPATOLÓGICO

Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários nos arquivos médicos dos respectivos hospitais colaboradores. Os dados foram primeiramente compilados em um formulário (**Anexo 3**) e em seguida tabulados em planilha do Excel (*Windows*). Resumidamente, foram obtidas as seguintes informações sobre cada paciente: data de diagnóstico, dados pessoais (idade, gênero, procedência), topografia do primeiro diagnóstico, estágio clínico (*Ann Arbor*), índice prognóstico, presença de sintomas B, associação com a síndrome de imunodeficiência adquirida, dados de evolução (remissão, recidiva, progressão da doença, óbito), dados de tratamento (quimioterápico ou radioterápico; tipo de protocolos terapêuticos). No **Apêndice 2** estão descritos conceitos/siglas de critérios clínicos e terapêuticos, bem estabelecidos na literatura.

Para fins de análise estatística, os dados foram agrupados em períodos de diagnóstico (P1=1954-1979; P2=1980-1999; P3=2000-2008). Estes períodos foram estabelecidos segundo a melhor padronização dos métodos diagnósticos, que tiveram seus marcos nas classificações de Kiel (mais difundida a partir da década de 80, com o emprego mais difundido da imunistoquímica) e da Organização Mundial da Saúde (definida ao final dos anos 90, e publicada em 2001, com atualização em 2008, com o aparecimento de marcadores mais bem definidos para entidades específicas).

Os grupos etários, infanto-juvenil (INF, até 15 anos), adulto-jovem (AD-J, 15-45 anos) e adulto-maduro (AD-M, 45 anos ou mais) foram estratificados conforme critérios estabelecidos no estudo de pacientes com linfoma de Hodgkin, descrito por Keegan et al. (2005). E, para os pacientes com linfoma não Hodgkin foi estabelecida idade de corte (maior que 60 anos) segundo a importância de risco clínico (pior prognóstico, por exemplo para LDGCB).

Os pacientes foram agrupados segundo a procedência regional: sudeste (S-SE); norte, nordeste e centro-oeste (N-NE-CO).

3.9 TESTES ESTATÍSTICOS

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa PRISMA (Versão 5.0; *GraphPad Software*) para testes de correlação de dados: Qui-quadrado ou teste exato de *Fisher*, para comparação de três grupos. Os estudos de sobrevida foram realizados utilizando-se o método de *Kaplan-Meier* (*log-rank* Mantel-Cox). O tempo de vida foi estimado no mínimo em 5 anos, com ajustes de grupos de estudo segundo o prognóstico de risco/idade do paciente.

Segundo definição do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a sobrevida dos pacientes foi estudada pelo teste designado com a sigla SDE (sobrevida doença específica) que considera o período entre o diagnóstico e o último evento (último seguimento ou morte pela doença). Este termo também é conhecido como “sobrevida causa específica” (*cause specific*

survival), definido no endereço:
<http://lymphoma.about.com/od/glossary/g/causespecific.htm>. Pacientes
mortos por outra causa são censurados. Para a Sobrevida global (SGD)
considerou-se o período entre o diagnóstico e o último evento, e incluem-se
pacientes mortos por outra causa.

4 RESULTADOS

4.1 LINFOMAS E CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

No estudo foram incluídos 2693 pacientes com diagnóstico de linfomas, 67% linfomas não Hodgkin (n= 1804) e 33% linfoma de Hodgkin (n= 889). Os laudos anatomopatológicos foram emitidos entre o ano de 1954 a 2008, e realizada revisão histopatológica, segundo a classificação da OMS, 2008.

Na reclassificação dos linfomas de Hodgkin (LH), o diagnóstico de origem sofreu alteração em 66% dos casos (587/889). Dentre os tipos de alterações feitas 88,5% (520/587), 28,1% ocorreram para adequação da classificação histológica atual; 42,9% inclusão do grau histológico do subtipo ENOD 1 ou 2, e 17,5% para troca de diagnóstico/tipos de LHc (**Tabela 3**).

Dentre os tipos histológicos mais comuns em linfomas de Hodgkin 68,2% foi diagnosticado como Esclerose nodular (ENOD), 21,8% Celularidade Mista (CM), 2,1% Depleção Linfocitária (DL) e 2,0% Rico em Linfócito (RL). O subtipo Predomínio linfocitário nodular (PLN) e não classificáveis (N-CL) apresentaram 5,8% do estudo (**Tabela 4**).

No total dos casos de linfomas não Hodgkin elegíveis 31,6% (851/1804) sofreram alteração de diagnóstico à revisão do anatomopatológico. Nos linfomas B periféricos indolentes 44,4% foram

reclassificados (246/554) e 33,5% dos linfomas de célula B/T ou T/NK de comportamento clínico mais agressivo (605/1804), **Tabelas 5 e 6**.

Nos linfomas B indolentes observou-se que as adequações de diagnóstico ocorreram em maior número para o subtipo Manto ou Manto blastóide (70,1%), seguidos dos Foliculares (42,7%), e Zona Marginal Esplênica (43,3%), **Tabela 5**. Nos LDGCB 53,4% dos casos tiveram alteração do diagnóstico; seguidos dos linfomas de grandes células reclassificados como Anaplásicas ou do Mediastino (48,8%). Entre os linfomas de células precursoras B/T e os de origem T periférica tiveram menores índices de modificações do diagnóstico 24% e 27%, respectivamente (**Tabela 6**).

Na classificação final dos linfomas não Hodgkin 69% foram agrupados como “agressivos” e 31% como “indolente”.

O maior grupo dos linfomas reclassificados é para a origem de células B (93,3%), seguidos aos de células T (7,5%). Apenas 1,9% dos casos não puderam ser tipados como B ou T e foram considerados inclassificáveis. Os linfomas de células precursoras perfazem 2,2% do total de linfomas elegíveis (**Tabela 7**).

Dentre os linfomas B mais comuns e de maior casuística no estudo são representados pelos tipos LDGCB (56,7%) e Folicular (19%), **Tabela 7**. Os linfomas T/NK perfazem 7,5% dos linfomas não Hodgkin. A maioria dos linfomas T é de células periféricas (92,6%), **Tabela 7**.

Para o estudo de correlação clinicopatológica dos 1804 linfomas não Hodgkin elegíveis apenas 12,6% (n= 228) não foram aproveitados devido à

ausência dos prontuários nos arquivos médicos. Nos linfomas de Hodgkin 21,8% dos prontuários não foram encontrados (194/889).

Tabela 3 - Reclassificação dos linfomas de Hodgkin, segundo a OMS (2008) (período do diagnóstico, 1954 à 2008).

Tipos de alterações	n	%
LH em LNH	24	4,1
LHc em outro subtipo	103	17,5
LHc em PLN	5	0,9
LH PLN em LHc [3=RL; 11=CM; 3=EN1; 2=EN2]	19	3,2
LH sem classificação em LHc	165	28,1
LH sem classificação em PLN	2	0,3
LH sem classificação ou LHc em Não-Classificável	17	2,9
LH ENOD sem grau, atualmente graduado em 1/2	252	42,9
Total de alterações Vs total de casos incluídos	587/889	66,0

***LH**=linfoma de Hodgkin; **LHc**=linfoma de Hodgkin clássico; **PLN**=predomínio linfocítico nodular; **ENOD**= esclerose nodular; **OMS**=Organização Mundial da Saúde.

Tabela 4 - Número de pacientes e tipos histológicos de linfoma de Hodgkin incluídos no estudo, com revisão do anatomopatológico.

Histologia	N	%
Esclerose Nodular	606	68,2
ENOD grau 1 (63,0% dos ENOD)	(382)	(42,9)
ENOD grau 2 (36,2% dos ENOD)	(219)	(24,6)
ENOD, sem graduação (0,8% dos ENOD)	(5)	(0,5)
Celularidade Mista	194	21,8
Rico em Linfócitos	18	2,0
Depleção Linfocitária	19	2,1
Predomínio Linfocítico Nodular	26	2,9
Não classificáveis	26	2,9
Total pacientes	889	100

***ENOD**= esclerose nodular.

Tabela 5 - Reclassificação dos linfomas não Hodgkin indolentes, segundo a OMS (2008) (período do diagnóstico, 1954 a 2008).

Tipos de alterações	n	%
Folicular		
LH em Folicular	4	3,0
LNH sem classificação em Folicular	2	1,5
Manto em LNH Folicular	5	3,8
Outros indolentes em Folicular	87	65,9
Agressivos em Folicular	22	16,7
LNH sem classificação para Folicular	12	9,1
Total alterações de diagnóstico Vs casos elegíveis	132/309	42,7
Manto/Manto blastóide		
LH em Manto ou em Manto blastóide	2	3,3
LNH sem classificação em Manto ou Manto blastóide	3	4,9
Indolentes (não Folicular) em Manto ou Manto blastóide	48	78,7
Folicular em Manto ou Manto blastoide	4	6,6
Manto em Manto blastóide e vice-versa	2	3,3
Agressivos em Manto blastóide	2	3,3
Total alterações de diagnóstico Vs casos elegíveis	61/87	70,1
Leucemia linfóide crônica (LLC)		
Agressivos em LLC	1	20,0
Indolentes em LLC	8	80,0
Total alterações de diagnóstico Vs casos elegíveis	9/51	9,8
Linfomas do tecido linfóide associado às mucosas (MALT)		
Agressivos em MALT	1	20,0
Indolentes em MALT	4	20,0
Total alterações de diagnóstico Vs total de casos elegíveis	5/29	17,6
Linfoma da zona marginal esplênica (LZME)		
Agressivos em LZME	1	7,7
Indolentes em LZME	12	92,3
Total alterações de diagnóstico Vs casos elegíveis	13/30	43,3
Outros indolentes		
Agressivos em indolentes	5	16,7
Indolentes com classificação anterior a 2008 em Não-Classificáveis	25	83,3
Total de alterações Vs total de casos elegíveis	246/554	44,4

*LH= linfoma de Hodgkin; LNH= linfoma não Hodgkin; OMS=Organização Mundial da Saúde.

Tabela 6 - Reclassificação dos linfomas não Hodgkin de células B/T precursoras e periféricas, segundo a OMS (2008) (diagnósticos 1954 a 2008).

Tipos de alterações	n	%
Linfoblástico n= 40/ Burkitt (n=110)		
Linfoblástico em Burkitt	9	25,0
Burkitt em Linfoblástico	2	5,6
Indolente para Burkitt	11	30,6
Indolente para Linfoblástico	6	16,7
Sem classificação para linfoblástico ou Burkitt	6	16,7
Outros linfomas B ou T para Linfoblástico	2	5,6
Total alterações Vs casos elegíveis	36/150	24,0
Linfoma difuso de grandes células B, DGCB (n=924)		
LH em LDGCB	13	2,6
LNH sem classificação em LDGCB	90	18,3
Indolentes em LDGCB	74	15,0
Outros Agressivos em LDGCB	20	4,1
Agressivos classificados <2008 em LDGCB	296	60,0
Total alterações Vs casos elegíveis	493/921	53,4
Grandes Células (Anaplásicas n=52; Mediastino n=34)		
LDGCB em GCB mediastino	10	23,8
LH em GC anaplásicas	5	11,9
LDGCB em GC Anaplásicas	4	9,5
Agressivos classificados <2008 em GC Anaplásicas	9	21,4
Agressivos em não-classificáveis	14	33,3
Total alterações Vs casos elegíveis	42/86	48,8
LNH T (n=126)		
Reclassificação dentro do grupo LNH-T periféricos	15	44,1
Agressivos classificados antes de 2008 em LNH- T periféricos	10	29,4
T agressivos em linfoma T/NK	9	26,5
Total alterações Vs casos elegíveis	34/126	27,0
Total casos reclassificados e elegíveis no estudo	605/1804	33,5

*LH= linfoma de Hodgkin; LNH= linfoma não Hodgkin; GC= grandes células; GCB= grandes células B; OMS=Organização Mundial da Saúde.

Tabela 7 - Classificação final dos linfomas não Hodgkin, segundo a OMS (2008) (período do diagnóstico, 1954 a 2008).

Não Hodgkin, Células B	N (%)	Não Hodgkin, Células T	N (%)
Célula Precursora B		Célula Precursora T	
LLA/Linfoblástico	10 (0,6)	LLA/Linfoblástico	10 (7,9)
Célula Periférica B		Célula T/NK Periférica	
LLC/Linfocítico	51 (3,1)	T periférico SOE	45 (35,8)
Folicular	309 (19,0)	T/NK nasal	16 (12,7)
Manto/Manto blastóide	87 (5,4)	Grandes células anaplásicas, CD30+ (ALK+ n=17; ALK- n=35)	52 (41,3)
Zona Marginal Esplênica	30 (1,8)	Outros linfomas T/NK periféricos	13 (10,3)
Zona Marginal Extranodal	29 (1,8)	Total linfomas, T periféricos	126 (92,6)
Zona Marginal Nodal	8 (0,5)	Total linfomas T	136 (7,5)
Indolentes, outros tipos	12 (0,7)	Linfoma sem definição T ou B	
Indolentes, inclassificáveis	28 (1,7)	Células precursoras, Linfoblásticos	20 (1,1)
Difuso de grandes células B SOE	921 (56,7)	Células periféricas, Inclassificáveis	14 (0,7)
Grandes células B do mediastino	34 (2,1)	Total sem T/B ; inclassificáveis	34(1,9)
Burkitt	110 (6,7)		
Agressivos B, outros tipos	5 (0,3)		
Total linfomas, B periféricos	1624 (99,4)		
Total linfomas B	1634 (90,6)		
Total de pacientes elegíveis no estudo		1804	

*LLA= leucemia linfóide aguda; LLC= leucemia linfóide crônica; SOE= sem outra especificação; OMS=Organização Mundial da Saúde.

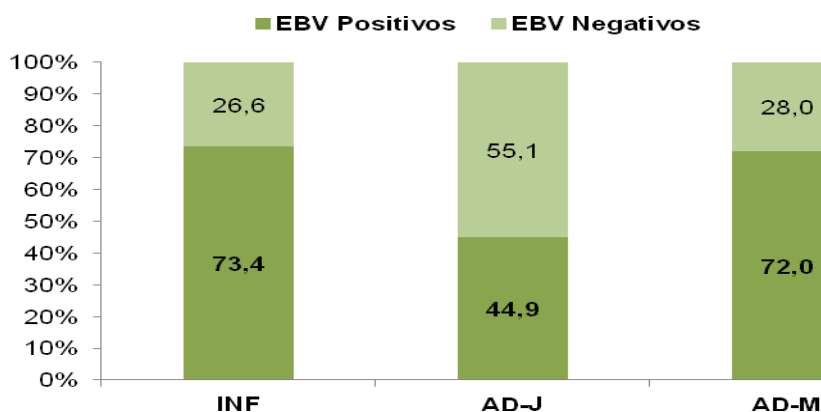
4.2 LINFOMAS DE HODGKIN E EPSTEIN BARR VIRUS

Do total de pacientes elegíveis 95,6% (850/889) foram estudados para a detecção de EBV; com 4,4% de perda de amostras teciduais inseridas nos blocos de *Tissue Microarray*. A maioria dos casos é de pacientes adultos, acima de 15 anos (79%), sendo 59% entre 15 e 45 anos (mediana 26,6 anos) e 20% acima de 45 anos (mediana de 59 anos). Os pacientes infanto-juvenis (menores de 15 anos) compreendem 21% do total dos casos (mediana de 9,2 anos).

A detecção viral foi de 56,4% (479/850). Não houve diferença significativa na escolha do método de estudo para avaliar a expressão de EBV (IHQ e ISH). Os casos negativos para o EBV foi maior quando avaliados pelo método de IHQ-LMP-1 (n=445), em relação ao de ISH-EBER (n=419). No entanto, a soma entre os casos positivos revelou idêntico aproveitamento de estudo (99,2%; n=843/850).

Houve variação da frequência de EBV entre os grupos etários ($p < 0.0001$) com maior frequência de EBV em pacientes dos extremos etários 73,4% e 72,0% (**Figura 6**). Do total de pacientes do grupo infantil (n=169) e adulto-maduro (n=182), 124 e 131 pacientes foram positivos ao EBV, respectivamente. A menor frequência (44,9%) de EBV foi observada no grupo adulto-jovem (224/499). Houve diferença significativa na análise entre o grupo INF Vs. ADJ e AD-J Vs. AD-M ($p < 0.0001$), sendo ausente a associação entre o grupo INF Vs. AD-M ($p=0.81$).

A etnia branca predominou neste grupo de pacientes (89,8%). Não houve diferença entre os grupos étnicos quanto à distribuição dos tipos histológicos e à frequência de EBV (**Tabelas 8 e 9**). O gênero masculino predominou (61,5%) e houve associação significativamente maior deste gênero à positividade para EBV, com 66,3% dos casos positivos ($p < 0.0001$; **Tabela 8**).



*Teste de Qui-quadrado ou exato de Fisher: ($p < 0.0001$) **entre grupos etários e entre o grupo INF Vs. AD-J e ADJ Vs. AD-M**; não-significativa a análise entre **INF Vs. AD-M**.

Figura 6 - Linfomas de Hodgkin clássicos distribuídos em grupos etários: **INF** (infanto-juvenil até 15 anos), **AD-J** (adultos jovens, 15-45 anos), **AD-M** (adultos acima de 45 anos), e frequência da expressão de EBV.

A maioria dos pacientes procedeu da região sul-sudeste do país (71,8%). Não houve diferença entre a positividade para o EBV entre as regiões geográficas do país agrupadas em S-SE ou N-NE-CO (**Tabela 8**). A maior frequência de positividade para o EBV em homens é significativa nas duas regiões geográficas agrupadas em S-SE (< 0.0001) e N-NE-CO

(0.0023), porém não há diferenças entre as regiões quanto à frequência de positividade para EBV em cada um dos gêneros (**Tabela 10**).

No estudo da classificação histológica, observou-se maior frequência dos tipos ENOD (70%) e CM (23%), e infrequentes DL e RL (2%), N-CL (3%). O tipo CM foi significativamente mais associado ao EBV, 82,9%, comparado ao 46,9% na ENOD ($p < 0.0001$; **Tabela 8**).

Nota-se que nos linfomas infrequentes a prevalência do vírus foi semelhante entre os tipos DL (64,7%), RL (68,4%), e os não classificáveis (61,5%). Não foi detectada a presença de EBV no tipo predomínio linfocítico nodular (PLN $n=26$). Não houve associação entre a expressão de EBV e a topografia do tecido no qual foi feita a sua detecção neste trabalho (**Tabela 8**).

O índice de prognóstico internacional foi baixo-intermediário baixo (IPS 0-2) na maioria dos pacientes (62,5%). A expressão do EBV foi significativamente maior para os que tiveram IPS intermediário/alto ≥ 3 (67,7%) daqueles com IPS 0-2 (47,2%); ($p = 0.04$, **Tabela 8**).

O estágio de *Ann Arbor* pouco menos frequente para os estádios precoces (I-II: 43,9%) que para os avançados (III-IV: 53,1%). Esses últimos apresentaram associação significativamente mais alta com o EBV (59,3%, contra 47,2% nos estádios precoces; $p=0.0026$, **Tabela 8**). Não houve diferença entre a associação com EBV nos grupos com e sem sintomas B (respectivamente 37,8% e 38,8%; **Tabela 8**).

Considerando-se apenas os LH clássicos com resultados válidos para a expressão de EBV, temos 850 casos. Os pacientes foram tratados

utilizando-se diferentes protocolos quimioterápicos ao longo dos tempos, sendo os mais utilizados ABVD (n= 282), MOPP-ABV (n= 139) e MOPP-ABVD (n=34): [Siglas do inglês: MOPP= *mechlorethamine, vincristine, procarbazine, prednisone*; ABV= *doxorubicin, bleomycin, vinblastine*; ABVD= *doxorubicine bleomycin, vinblastine, dacarbazine*]. Outros esquemas foram utilizados em 99 pacientes. Radioterapia exclusiva foi utilizada em 38 e em 258 não pudemos obter a informação sobre o tratamento. A relação com o EBV dos pacientes tratados com cada um desses esquemas foi, respectivamente, 124/282 (43,9%), 81/139 (58,3%), 22/34 (64,7%), 32/38 (84,2%) e 55/99 (55,5%). Dos casos sem informação sobre o tratamento, 163/258 foram positivos para EBV (63,1%).

A **Tabela 11** resume os dados clinicopatológicos dos pacientes que utilizaram o esquema ABVD isolado (n= 282) e MOPP com ABVD ou ABV (n= 173). Não houve significância em nenhum dos parâmetros analisados, nem em relação à sobrevida doença específica (SDE), segundo o status do EBV para cada um desses esquemas (**Figura 7**).

Para a análise de sobrevida de pacientes que utilizaram os três esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e ABVD (n=455), não houve diferença significativa para o estudo (p=0.7928). A frequência de EBV foi semelhante entre pacientes positivos e negativos ao vírus (49,9% Vs. 50,1%), **Tabela 12; Figura 8**. No entanto, o estudo de SGD dos 850 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, mostrou diferença de sobrevida em relação ao status de EBV (p=0.0015), independente do tratamento

terapêutico (**Tabela 13; Figura 9**). Nesta análise a frequência de EBV nos casos positivos foi de 56,4%, e nos negativos (43,9%).

A evolução clínica em relação a resposta terapêutica foi efetiva quando observado ausência de recidivas em 72,7% dos casos (442/850), e quanto a expressão de EBV foi semelhante entre pacientes que recidivaram 52,4% (87/166) e os de melhor evolução terapêutica, sem recidivas (52,9%; 234/442).

Tabela 8 - Dados demográficos, clinicopatológicos e “status” de EBV Pacientes com linfoma de Hodgkin Clássico (n= 850), diagnóstico 1954-2008.

Categorias(n)	N (%)	EBV (+)	EBV(-)	p valor
Gênero				
Masculino	523(61,5)	347(66,3)	176(33,7)	< 0.0001*
Feminino	327(38,5)	132(40,4)	195(59,6)	
Etnia				
Branca	763(89,8)	428(56,1)	335(43,9)	NS*
Não Branca	87(10,2)	51(58,6)	36(41,4)	
Região Geográfica				
S-SE	610(71,8)	331(54,3)	279(45,7)	NS*
N-NE-CO	141(16,6)	83(58,9)	58(41,1)	
SD	99(11,6)	65(65,6)	34(34,3)	
Topografia				
Nodal	839(98,7)	470(56,0)	369(44)	NS*
Extranodal	11(1,3)	9(81,8)	2(18,2)	
Histologia				
ENOD	595(70)	279(46,9)	316(53,1)	<0.0001*
CM	193(22,7)	160(82,9)	33(17,1)	
DL	17(2)	11(64,7)	6(35,3)	
RL	19(2,2)	13(68,4)	6(31,6)	
N-CL	26(3,1)	16(61,5)	10(38,5)	
IPS				
0-2	531(62,5)	252(47,5)	279(52,5)	0.0405*
≥3	31(3,6)	21(67,7)	10(32,3)	
SD	288(33,8)	206(71,5)	82(28,4)	
Ann Arbor				
I-II	286(43,9)	135(47,2)	151(52,8)	0.0026*
III-IV	366(53,1)	217(59,3)	149(40,7)	
SD	198(23,3)	127(26,5)	71(19,1)	
Sintomas B				
Presente	322(37,8)	178(55,3)	144(44,7)	NS*
Ausente	330(38,8)	174(52,7)	156(47,3)	
SD	198(23,3)	117(59,1)	71(35,8)	
Tratamento Terapêutico				
Somente QT	252(41,5)	144(57,1)	108(42,9)	NS*
Somente RT	39(6,4)	34(87,2)	5(12,8)	
QT+RT	317(52,1)	135(42,6)	182(57,4)	
SD	242(28,4)	166(68,5)	76(31,4)	
Total	850 (100)	479(56,4)	371(43,6)	

*Teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher; **NS**=não significativo; **SD**=Sem dados; **Regiões**: **S**=sul; **SE**=sudeste; **N**=Norte; **NE**=nordeste; **CO**=centro-oeste. **QT**=quimioterapia; **RT**=radioterapia (Critérios clínicos, **Apêndice 2**).

Tabela 9 - Tipos histológicos de pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos e grupos étnicos.

	Tipos Histológicos					*p-valor
	ENOD	CM	RL	DL	N-CL	
Etnia	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	
Branca n= 773	552(71,4)	168(21,7)	13(1,7)	15(1,9)	25(3,2)	NS*
Não Branca n= 90	54(60)	26(25,5)	5(5,5)	4(4,4)	1(1,1)	

*Teste do Qui-quadrado; **ENOD**=Esclerose Nodular; **CM**=Celularidade Mista; **RL**= Rico em Linfócitos; **DL**=Depleção Linfocitária; **N-CL**= Não classificável; **NS**=não significativo.

Tabela 10 - Relação de pacientes EBV positivos com linfoma de Hodgkin clássicos, distribuídos em gêneros e regiões geográficas do país.

Gênero	S-SE	EBV(+) n(%)	EBV(-) n(%)	p valor*
Masculino	368	238(64,7)	130(35,3)	<0.0001*
Feminino	242	93(38,4)	149(61,6)	
Total	610	331(54,3)	279(45,7)	

Gênero	N-NE-CO	EBV(+) n(%)	EBV(-) n(%)	p valor*
Masculino	90	62(68,9)	28(31,1)	0.0023*
Feminino	51	21(41,2)	30(58,8)	
Total	141	83(58,9)	58(41,1)	

*Teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher; Regiões: **S**=sul; **SE**=sudeste; **N**=Norte; **NE**=nordeste; **CO**=centro-oeste. Não há significância quando cada um dos gêneros e comparado entre as regiões do país, em relação à frequência de EBV.

Tabela 11 - Pacientes com linfoma LHc com tratamento terapêutico ABVD ou MOPP-ABVD/ABV (n455): dados clinicopatológicos e “status” de EBV.

Categorias	[1]	EBV (+)	[2]	EBV (+)	p
n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	valor
Histologia	N= 173		N= 282		
ENOD	112(64,7)	52(46,4)	221(78,4)	85(38,5)	NS*
CM	49(28,3)	43(87,8)	48(17)	34(70,8)	
DL	4(2,3)	2(50)	3(1,1)	2(66,7)	
RL	1(0,6)	1(100)	6(2,1)	3(50)	
N-CL	7(4,0)	5(71,40)	4(1,4)	0	
IPS					
0-2	135(96,4)	72(53,3)	271(96,1)	116(42,8)	NS*
≥3	5(3,6)	4(80)	11(3,9)	8(72,7)	
SD	33(19)	27(82)	0	0	#
Ann Arbor					
I-II	61(35,3)	30(49,2)	149(52,8)	57(38,3)	NS*
III-IV	112(64,7)	72(64,3)	133(47,2)	67(50,4)	
Sintomas B					
Presente	101(58,4)	60(59,4)	149(52,8)	75(50,3)	NS*
Ausente	72(41,6)	43(59,7)	133(47,2)	49(36,8)	
Recidiva					
Presente	66(38,2)	37(56,1)	60(21,3)	21(35)	NS*
Ausente	107(61,8)	66(61,7)	222(78,7)	103(46,4)	
Situação final/último retorno clínico					
VSD	91(52,6)	52(57,1)	219(77,7)	97(44,3)	NS*
VCD	20(11,6)	12(60)	22(7,8)	8(36,4)	
OBITO	62(35,8)	39(62,9)	41(14,5)	19(46,3)	

*Teste do Qui-quadrado ou Exato de Fisher; **NS**=não significativo;# Não avaliado **Teste Kaplan-Meier, Sobrevida doença específica (Log-rank, Mantel-Cox). **Esquemas terapêuticos [1]** MOPP-ABV-ABVD; **[2]** ABVD; **VSD**=vivos sem doença; **VCD**= vivos com doença; **SD**=Sem dados (Critérios clínicos e terapêuticos, **Apêndice 2**).

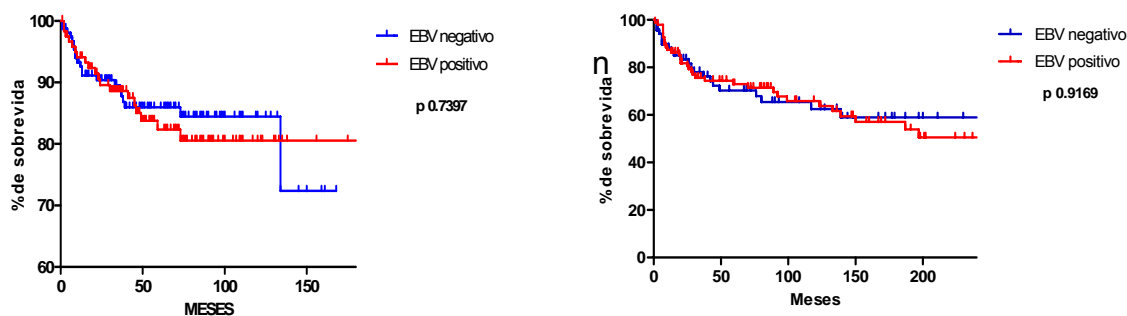


Figura 7 - Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com LHc segundo status do EBV. **A=** que utilizaram tratamento ABVD (n=284, seguimento de 180m). **B=** que utilizaram tratamento MOPP/ABV-ABVD (n=173, seguimento de 240m).

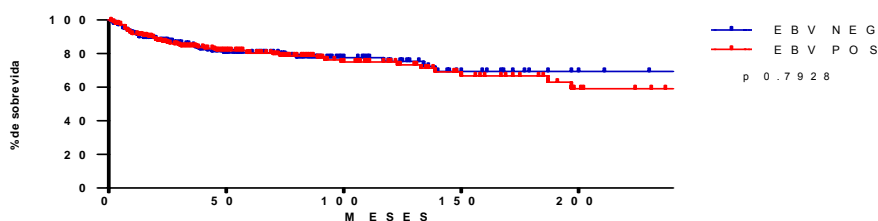


Figura 8 - Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes EBV positivos com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos (LHc), em seguimento por 240 meses (n=455). Pacientes que utilizaram esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD.

Tabela 12 - Resumo das taxas de sobrevida dos 455 pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos, que usaram os esquemas: ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 20 anos	
EBV negativo	n=228(50,1%)
Óbitos	n=45(19,7%)
Vivos	n=183(80,3%)
EBV positivo	n=227 (49,9%)
Óbitos	n=55(24,2%)
Vivos	n=172(75,8%)

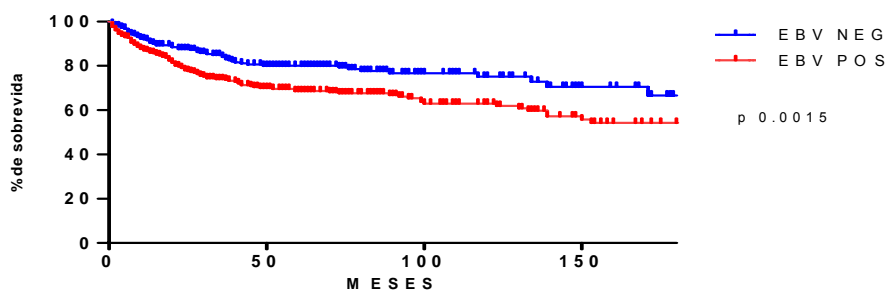


Figura 9 - Sobrevida global (SGD) de pacientes EBV positivos com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos (LHc), em seguimento por 180 meses (n=850).

Tabela 13 - Resumo das taxas de sobrevida dos 850 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 15 anos	
EBV negativo	n=371(43,6%)
Óbitos	n=60(16,2%)
Vivos	n=311(83,8%)
EBV positivo	n=479 (56,4%)
Óbitos	n=124(25,9%)
Vivos	n=355(74,1%)

Para melhor entender os resultados de sobrevida foi realizada análise quanto a idade, período de diagnóstico, tipo histológico, esquemas terapêuticos, e critérios clínicos que definem melhor o perfil desses pacientes (estádio *Ann Arbor* e IPI=Índice de prognóstico internacional), que serão apresentados na sequência do estudo.

Segundo os critérios clínicos *Ann Arbor* e estudo de sobrevida, não houve relação ao status de EBV para pacientes com doença em estágio precoce da doença (I-II, $p=0.4044$; $n=282$) e, com IPS 0-2 entre os grupos etários ($p=0.5521$; $n=531$). A casuística foi menor para pacientes com IPS ≥ 3 ($n=31$), dificultando a análise.

Para pacientes com linfoma e Hodgkin clássico (n=366) e com doença avançada (III-IV) houve diferença significativa no estudo (p=0.0240). Notou-se que somente os mais jovens (INF n=72; AD-J n=200) tiveram relação com sobrevida desfavorável para os casos positivos ao EBV (INF p=0.05; AD-J p=0.0030), quando da estratificação de idade dos pacientes, **Figura 10 e 11; Tabela 14 e 15**. A sobrevida foi favorável para pacientes positivos ao EBV com idade superior a 45 anos p=0.05 (n=81), **Figura 12, Tabela 16**.

Os pacientes infanto-juvenis tiveram maior frequência de EBV nos casos positivos (72,2%) do que os casos negativos (29,1%), **Tabela 14, Figura 10** Nos adultos jovens a frequência de EBV foi semelhante entre pacientes positivos e negativos (49% Vs. 51%), **Tabela 15, Figura 11**. Os adultos (>45 anos) tiveram frequência de EBV positivos de 79% e negativos de 21%, **Tabela 16, Figura 12**. Nas três análises é observada que as frequências de óbitos EBV positivos são maiores para o grupo infanto-juvenil e adulto-jovem, em relação ao grupo adulto-maduro.

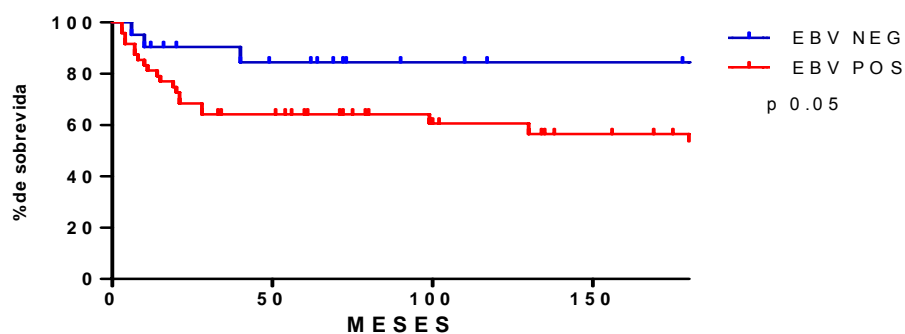


Figura 10 - Sobrevida global (SGD) de pacientes com idade de 0-15 anos e estágio clínico *Ann Arbor* III-IV, com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássico, em seguimento por 180 meses (n=72).

Tabela 14 - Resumo das taxas de sobrevivência dos 72 pacientes (0-15anos) com linfoma de Hodgkin clássico e estágio clínico *Ann Arbor* III-IV, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevivência relativa (%), em 15 anos	
EBV negativo	n=21(29,1%)
Óbitos	n=3(14,3%)
Vivos	n=18(85,7%)
EBV positivo	n=51 (70,8%)
Óbitos	n=22(43,1%)
Vivos	n=29(56,9%)

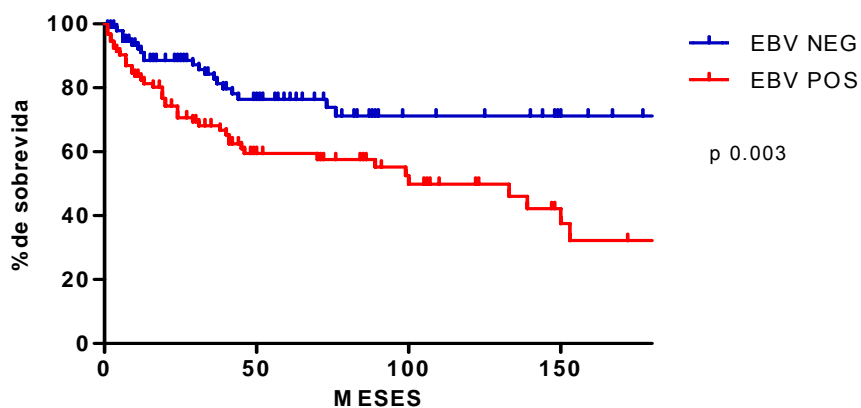


Figura 11 Sobrevida global (SGD) de pacientes com idade adulta (15,1-45 anos) e estágio clínico *Ann Arbor* III-IV, com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássico, em seguimento por 180 meses (n=200).

Tabela 15 - Resumo das taxas de sobrevida dos 200 pacientes (15,1-45 anos) com linfoma de Hodgkin clássico e estágio clínico *Ann Arbor* III-IV, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 15 anos.	
EBV negativo	n=102(51%)
Óbitos	n=22(21,6%)
Vivos	n=80(78,4%)
EBV positivo	n=98 (49%)
Óbitos	n=45(45,9%)
Vivos	n=53(54,1%)

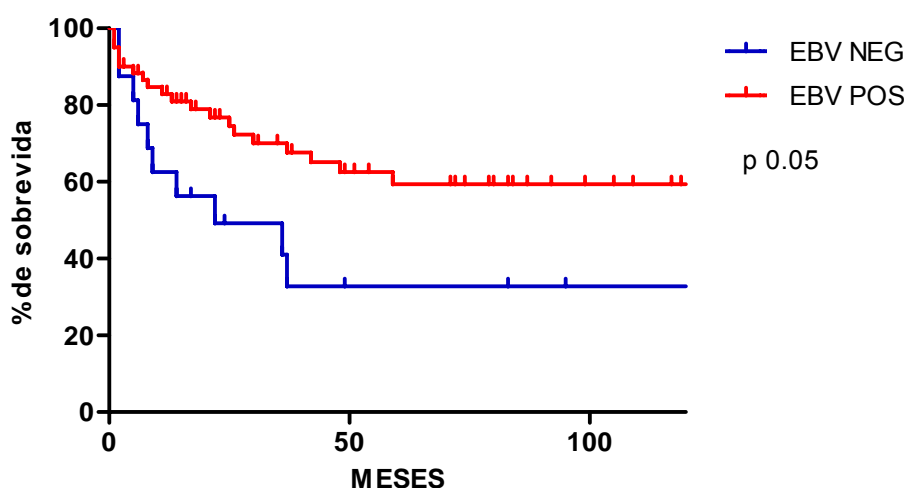


Figura 12 - Sobrevida global (SGD) de pacientes com idade adulta (>45 anos) e estágio clínico *Ann Arbor* III-IV, com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássicos, em seguimento por 120 meses (n=81).

Tabela 16 – Resumo das taxas de sobrevivida dos 81 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (>45 anos) e estágio clínico *Ann Arbor* III-IV, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevivida relativa (%), em 10 anos.	
EBV negativo	n=17(21%)
Óbitos	n=11(64,7%)
Vivos	n=6(35,3%)
EBV positivo	n=64 (79%)
Óbitos	n=26(40,7%)
Vivos	n=38(59,3%)

4.2.1 Linfoma de Hodgkin clássico: pacientes EBV positivos estratificados por períodos de diagnóstico

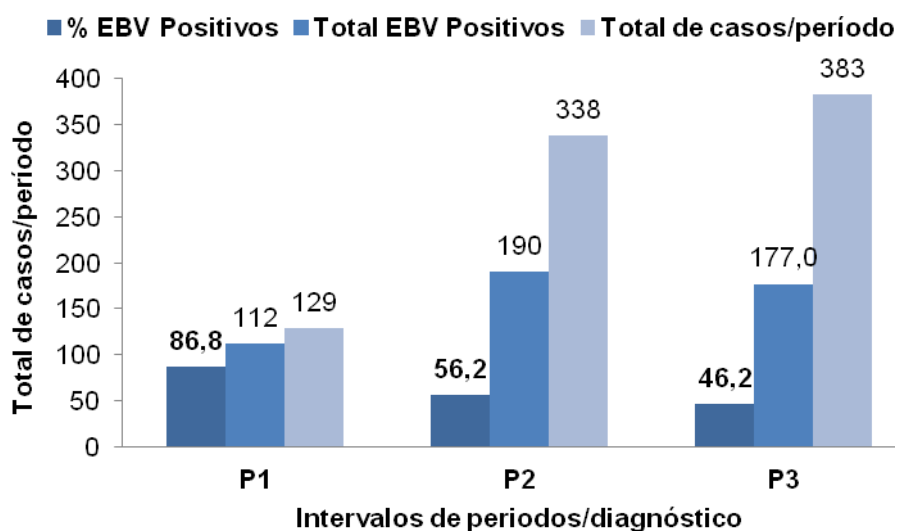
Os 850 pacientes com resultados avaliáveis de EBV em LHc foram estratificados pelo período em que foi feito o diagnóstico: P1 de 1954 a 1979 (n= 129), P2 de 1980 a 1999 (n= 338) e P3 de 2000 a 2008 (n= 383). Houve diferença significativa na frequência de expressão de EBV nos três períodos, sendo, respectivamente, 86,8% (112+/129), 56,2% (190+/338) e 46,2% (177+/383), ($p < 0.0001$; **Figura 13**).

Nos três grupos etários houve redução da associação dos LHc com EBV ao longo dos três períodos. Na faixa etária infanto-juvenil, a frequência de EBV+ foi de 93,9% em P1 (31/33), 71,1% em P2 (59/83) e 64,2% (34/53) em P3 ($p = 0.0079$). Na faixa de adultos jovens, a frequência de EBV+ foi de 85,7% (60/70) em P1, 43,8% (85/194) em P2 e 33,6% (79/235) em P3 ($p < 0.0001$). Na faixa etária de adultos acima dos 45 anos, não houve diferença significativa na frequência de casos EBV+ nos três períodos 80,8% em P1 (21/26), 75,4% (46/61) em P2 e 67,4% (64/95) em P3; ($p = 0.31$).

Figura 14.

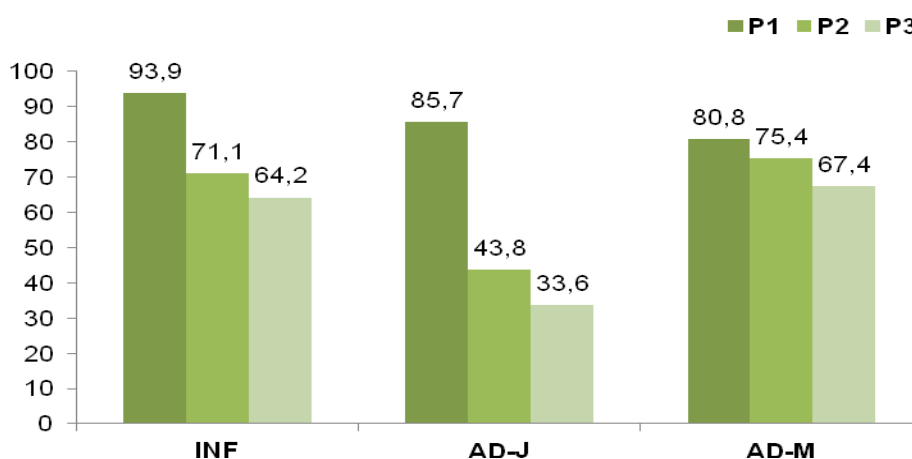
Na análise da expressão de EBV distribuídos por períodos e entre os grupos etários, houve diferença significativa em P2 (INF 71,1% X AD-J 43,8% X AD-M 75,4%, $p < 0.0001$), em P3 (INF 64,2% X AD-J 33,6% X AD-M 67,4%, $p < 0.0001$), e não houve diferença na análise em P1 ($p = 0.0306$),

Figura 14.



*p valor, teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher ($p < 0.0001$).

Figura 13 - Linfomas de Hodgkin clássicos distribuídos em períodos de diagnóstico (P1=1954-1979; P2=1980-1999; P3=2000-2008) em relação ao número de casos e frequências de pacientes EBV positivos.



*p valor, teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher ($p = 0.0041$).

Figura 14 - Pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos distribuídos em períodos de diagnóstico (P1=1954-1979; P2=1980-1999; P3=2000-2008), grupos etários em relação à frequência da expressão de EBV.

Quando considerada a expressão de EBV nos LHc distribuídos por gêneros nos três períodos, apenas em P1 não houve diferença entre a positividade para EBV entre homens e mulheres. Nos períodos P2 e P3 os homens tiveram expressão de EBV mais frequente (P2 com $p < 0.0001$ e P3 com $p = 0.0041$; **Tabela 17**). Não houve associação de sobrevivência e status de EBV entre pacientes distribuídos de acordo com os períodos de diagnóstico estabelecidos (P1 $p = 0.1934$; P2 $p = 0.4969$; P3 $p = 0.7159$).

Tabela 17 - Pacientes com LHc EBV positivos distribuídos de acordo com o período de diagnóstico e gênero.

	P1	N. EBV+	%	N. EBV-	%	p valor*
Masculino	104	90	87	14	13	NS*
Feminino	25	22	88	3	12	
P2						
Masculino	197	134	68	63	32	0,0001*
Feminino	141	56	40	85	60	
P3						
Masculino	222	123	55	99	45	0,0043*
Feminino	161	54	34	107	66	

* Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher; **NS**=não significativo; **P**=períodos de diagnóstico: **1**=1954-1979; **2**=1980-1999; **3**=2000-2008.

4.2.2 Tipos histológicos Vs. períodos de diagnóstico

O subtipo Esclerose nodular (ENOD) correspondeu a 61,2% dos linfomas de Hodgkin clássicos (LHc) em P1, 69,2% em P2 e 73,6% em P3. O tipo CM correspondeu a 26,4% dos LHc em P1, 24,6% em P2 e 19,8% em P3. Não houve diferença significativa entre estas frequências ($p = 0.107$; **Tabela 18**).

Em relação à frequência de positividade para EBV nos casos classificados como ENOD, esta decresceu significativamente: 82,3% em P1, 45,3% em P2 e 38,3% em P3 ($p= 0.0006$; **Tabela 18**). Já a frequência de expressão de EBV nos casos classificados como CM decrescem nos três períodos, mas não significativamente (valor aproximado): 94,1% em P1, 83,1% em P2 e 77,6% em P3 ($p=0.08$; **Tabela 18**).

Tabela 18 - Classificação histológica de pacientes com linfoma de Hodgkin clássicos (n850), de acordo com o período de diagnóstico e EBV.

Histologia	[1] n129	EBV (+) n112	[2] n338	EBV (+) n190	[3] n383	EBV (+) n177
ENOD	79(61,2)	65(82,3)	234(69,2)	106(45,3)	282(73,6)	108(38,3)
CM	34(26,4)	32(94,1)	83(24,6)	69(83,1)	76(19,8)	59(77,6)
DL	7(5,4)	6(85,7)	8(2,4)	5(62,5)	4(1,0)	2(50)
RL	1(0,8)	1(100)	5(1,5)	4(80)	11(2,9)	6(54,5)
N-CL	8(6,2)	8(100)	8(2,4)	6(75)	10(2,6)	2(20)

*Teste Qui-quadrado ou exato de Fisher $p 0.0486$. **P** (período de diagnóstico): **P1**=1954-1979; **P2**=1980-1999; **P3**=2000-2008. Tipos histológicos de linfoma de Hodgkin clássicos (LHc): **ENOD**=esclerose nodular; **CM**=celularidade mista; **DL**=depleção linfocitária; **RL**=rico em linfócitos; **N-CL**=não classificáveis.

A classificação do subtipo ENOD em graus 1 e 2 não mostrou diferença da distribuição de EBV no total do estudo, e entre os grupos etários (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Classificação dos tipos histológicos da esclerose nodular (graus 1 e 2) segundo o status de EBV e nos grupos etários.

Histologia	EBV (+)		EBV (-)						
	N= 589	%	N= 279	%	N= 310	%			
ENOD 1	374	63	175	47	199	53			
ENOD 2	215	37	104	48	111	52			
	INF	EBV	%	AD-J	EBV	%	AD-M	EBV	%
ENOD 1	66	39	59	248	93	59	60	43	72
ENOD 2	33	21	64	138	52	64	44	31	70

*Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher (não significativo). **ENOD**= esclerose nodular; **ENOD 1 e 2** = grau histológico; **INF**= infante-juvenil (0-15anos), **AD-J**= adultos jovens (15,1-45anos), **AD-M**= adultos maduros (>45 anos).

4.2.3 Linfoma de Hodgkin clássico: pacientes EBV positivos estratificados por idade

Os dados da **Tabela 20** mostram os dados clínicos e patológicos dos linfomas de Hodgkin clássicos (n=850), segundo as faixas etárias e a expressão de EBV. Há diferença significativa entre a relação da frequência viral nos tipos ENOD e CM, que é menor nas faixas infante-juvenil e de adultos maduro e maior na faixa dos adultos jovens ($p < 0.0001$). Também a frequência de expressão de EBV no tipo ENOD é significativamente maior dentre os pacientes das faixas infante-juvenil e de adultos maduros, sendo menor na faixa dos adultos jovens ($p = 0.0005$). Não há diferença da frequência de EBV no tipo CM entre as faixas etárias ($p = 0.81$).

Não houve diferença entre as faixas etárias parâmetros de IPS e estágio da doença. Em relação aos sintomas B, ele esteve

significativamente mais presente em adultos (jovens e maduros), quando comparados à faixa infanto-juvenil ($p= 0.0006$; **Tabela 20**).

Quando analisadas as faixas etárias isoladamente, não houve diferença na expressão de EBV e parâmetros de IPS nas três faixas etárias. O estágio de *Ann Arbor* mais avançado (III+IV) foi significativamente mais relacionado à positividade para EBV apenas na faixa etária de adultos jovens ($p=0.0056$), mas não nas demais. Em relação à presença de sintomas B, apenas na faixa etária de adultos maduros, ela esteve significativamente associada à expressão de EBV ($p= 0.0006$), mas não nas demais.

4.2.4 Linfoma de Hodgkin clássico ENOD e CM: pacientes EBV positivos estratificados por idade e períodos de diagnósticos

Observa-se que no total de pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássico, subtipo ENOD há diferença de distribuição de EBV em relação ao período de diagnóstico ($p<0.0001$), com presença de expressão viral maior para P1 (82,3%), e menor para P2 (45,4%) e P3 (38,3%) e quanto ao grupo etário maior expressão viral para a idade infanto-juvenil (60,6%) e adulto-maduro (69,8%), e menor para AD-J (37,2%), $p<0.0001$, **Tabela 21**.

Tabela 20 - Pacientes com linfomas de Hodgkin clássicos (n=850), diagnosticados entre 1954-2008. Distribuição dos pacientes, de acordo com as faixas de idade e a frequência de expressão de EBV.

	INF n(%)		ADJ n(%)		AD-M n(%)		p valor
	LHc	EBV (+)	LHc	EBV (+)	LHc	EBV (+)	
Histologia							
ENOD	99(58,6)	60(60,6)	390(78,2)	145(37,2)	106(58,2)	74(69,8)	0.0005*
CM	59(34,9)	54(91,5)	77(15,4)	60(77,9)	57(31,3)	46(80,7)	NS*
RL	4(2,4)	3(75)	7(1,4)	5(71,4)	6(3,3)	3(50,0)	
DL	2(1,2)	2(100)	9(1,8)	6(66,6)	8(4,4)	5(62,5)	
N-CL	4(2,4)	4(100)	17(3,4)	9(52,9)	5(2,7)	3(60)	#
IPS							
0-2	104(61,5)	67(64,4)	332(66,5)	115(34,6)	107(58,8)	75(70,1)	NS*
≥3	4(2,4)	3(75)	16(3,2)	8(50)	11(6)	10(90,9)	
SD	61(36,1)	54(88,5)	151(30,3)	101(66,9)	64(35,2)	46(71,9)	#
Estádio clínico Ann Arbor							
I-II	53(31,4)	39(73,6)	181(36,3)	62(34,3)	49(26,9)	33(67,3)	NS*
III-IV	72(42,6)	51(70,8)	211(42,3)	102(48,3)	83(45,6)	64(77,1)	
SD	44(26)	34(77,3)	107(21,4)	60(56,1)	50(27,5)	34(68)	
Sintomas B							
Presente	44(26)	33(75)	200(40,1)	79(39,5)	78(42,9)	66(84,6)	<0.0006*
Ausente	81(47,9)	57(70,4)	194(38,9)	86(44,3)	55(30,2)	31(56,4)	
SD	44(26)	34(77,3)	105(21)	59(56,2)	49(26,9)	34(69,4)	#
TOTAL	169(100)	124(73,4)	499	224(44,9)	182	131(72)	

* Teste do Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher; # excluídos da análise; **NS**=não significativo. **Idade/grupos etários** [intervalos]: **INF**=infantil [0-15a]; **AD-J**=adulto-jovem [15-45a]; **AD-M**=adulto-maduro [>45a]; **SD**=sem dados; Estadiamento clínico *Ann Arbor*: doença menos **EC I-II**, e mais avançada - **EC III-IV**; **IPS**=índice de prognóstico internacional para a doença (0-2, baixo risco; >3 intermediário/alto risco). Critérios clínicos, **Apêndice 2**.

Na análise de distribuição de ENOD/EBV positivos entre os períodos de diagnósticos em cada grupo etário, houve diferença significativa de expressão viral em pacientes com idade INF ($p=0.0245$) e AD=J ($p<0.0001$) e não houve diferença para adultos >45 anos ($p<0.9705$), **Tabela 21**. A maior frequência de EBV no grupo INF foi observada no P1 (92,3%), como para pacientes adultos-jovens P1 (83,3%). Nos pacientes AD-M, em relação as outras idades, a expressão de EBV foi maior em P2 (69,2%) e P3 (69,3%), e menor em P1 (72,2%).

Houve diferença na distribuição de ENOD/EBV em cada período de diagnóstico entre os grupos etários P2 ($p<0.0001$), e P3 ($p<0.0001$), e sem valor significativo em P1 ($p=0.3354$). Nesta análise, as frequências de EBV foram maiores nos extremos etários (INF e AD-M) em P2 e P3, e mais elevadas, com frequências semelhantes no P1, **Tabela 21**.

O estudo entre a distribuição de EBV em pacientes com CM não teve diferença significativa para nenhuma das análises realizadas: entre períodos de diagnóstico ($p=0.2202$); entre os grupos etários ($p=0.0984$); entre os períodos de diagnóstico de cada grupo etário (INF $p=0.9169$; AD-J $p=0.3859$; AD-M $p=0.1688$) e em cada período de diagnóstico por grupo etário (P1 $p=0.7911$; P2 $p=0.1657$; P3 $p=0.3317$), **Tabela 21**.

Tabela 21 - Classificação dos tipos histológicos ENOD e CM, segundo o status de EBV nos grupos etários e períodos de diagnósticos.

	TOTAL		INF		AD-J		AD-M	
	LHc/EBV	% EBV	LHc/EBV	% EBV	LHc/EBV	% EBV	LHc/EBV	% EBV
ENOD								
PT	595/279	46,8	99/60	60,6	390/145	37,2	106/74	69,8
P1	79/656	82,3	13/12	92,3	48/40	83,3	18/13	72,2
P2	234/106	45,3	55/33	60,0	152/54	35,5	26/18	69,2
P3	282/108	38,3	31/15	48,3	190/51	26,8	62/43	69,3
CM								
PT	193/160	82,9	59/54	91,5	77/60	77,9	57/46	80,7
P1	34/32	94,1	15/14	93,3	13/12	92,3	6/6	100
P2	83/69	83,1	25/23	92,0	35/26	74,2	23/20	86,9
P3	76/59	77,6	19/17	89,4	29/22	75,8	28/20	71,4

*Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. **P**=período de diagnóstico; **PT**=(1954-2008); **P1**=(1954-1979); **P2**=(1980-1999); **P3**=(2000-2008); **EBV**=Epstein Barr Vírus; **INF**=infanto-juvenil (0-15 anos); **AD-J**=adulto-jovem (15,1-45 anos); **AD-M**=adulto maduro (>45 anos). **LHc**=Linfoma de Hodgkin Clássico; Tipos Histológicos de LHc, **CM**=Celularidade Mista; **ENOD**=Esclerose Nodular.

4.2.5 Análise de sobrevida de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação a idade, terapêutica e tipo histológico

A sobrevida global, SGD (n=850) mostrou-se mais desfavorável em pacientes com linfoma de Hodgkin clássico com expressão de EBV, apenas nas faixas etária infanto-juvenil (p= 0.0206) e de adultos jovens (p <0.0001), **Figuras 15 e 16**, porém não quanto aos adultos maduros, p=0.2618.

Nessa análise os pacientes infanto-juvenis (n=175) apresentaram maior frequência de casos EBV positivos (70,9%), em relação aos negativos (29,4%), **Tabela 22; Figura 15**. Nos adultos jovens (15,1 a 45 anos) os casos EBV positivos foi de 44,9% e os negativos 55,1% (**Tabela 23, Figura**

16). Sendo evidente maior número de casos EBV positivos em pacientes que evoluíram ao óbito em ambos os grupos.

Quando tomamos apenas os pacientes submetidos aos esquemas quimioterápicos que incluíram ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD (n= 455), apenas os pacientes adultos (acima dos 45 anos) tiveram diferença, sendo favorável a sobrevida de doença específica (SDE) para pacientes EBV positivos ($p= 0.0279$); **Tabela 24; Figura 17**. Esses pacientes apresentaram maior frequência de casos EBV positivos (71,1%) e menor para os negativos (28,9%), sendo a frequência superior de óbitos negativos ao EBV, com seguimento clínico de 5 anos (n=90).

Não houve diferenças significantes em pacientes com estes esquemas terapêuticos, quer para sobrevida global (SGD), quer para a doença específica (SDE), nas faixas etárias infanto-juvenis e adultos jovens (menores ou iguais a 45 anos). Tampouco houve diferenças significantes na sobrevida relacionada ao EBV, quando os pacientes foram estratificados nos três períodos estudados.

Quando avaliado isoladamente, por ser o subtipo histológico com maior número de pacientes, a análise de sobrevida global (SGD) de pacientes com ENOD mostrou que a expressão de EBV está relacionada a sobrevida desfavorável apenas nos grupos infanto-juvenil ($p= 0.0242$; **Figura 18**) e adultos jovens ($p < 0.0001$; **Figura 19**). Os pacientes adultos maduros (>45 anos) com ENOD EBV positivos não tiveram associação à sobrevida global da doença ($p=0.1941$).

Neste estudo, observou-se que em casos infanto-juvenis a maior frequência foi de casos EBV positivos (60,6%), e menores para os negativos (39,4%). Sendo evidente a maior frequência de pacientes que evoluíram ao óbito EBV positivos, em seguimento clínico de 15 anos (n=99), **Tabela 25; Figura 18**. Nos pacientes adultos (15,1-45 anos) a frequência de casos negativos ao EBV foi de 62,8% e positivos 37,2%. Há maior expressão de EBV naqueles que evoluíram ao óbito, em seguimento clínico de 15 anos (n=390), **Tabela 26; Figura 19**.

A análise de sobrevida de doença específica (SDE) de pacientes que utilizaram esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD positivos ao EBV, com diagnósticos de Esclerose Nodular (ENOD) mostrou que o grupo infanto-juvenil e adulto jovens teve sobrevida favorável para os casos negativos de EBV (INF $p=0.0010$; ADJ $p=0.03$), **Figuras 20, 21**.

Nessa análise os pacientes infanto-juvenis (n=41) tiveram frequência de casos EBV positivos (61%) e menores para pacientes os negativos (39%), com maior frequência de óbitos nos EBV positivos, em seguimento clínico de cinco anos (**Tabela 27, Figura 20**). Os pacientes adultos jovens (15,1-45 anos) tiveram maior frequência de casos EBV negativos (68,9%), com menor frequência de óbitos (17,1%), em relação aos EBV positivos (29,7%), em seguimento clínico de cinco anos (n=238), **Tabela 28; Figura 21**.

Ao contrário dos pacientes infanto-juvenis e adultos jovens, os de idade adulta maior que 45 anos (n=50) apresentaram sobrevida favorável para pacientes EBV positivos ($p=0.0407$), **Tabela 29; Figura 22**.

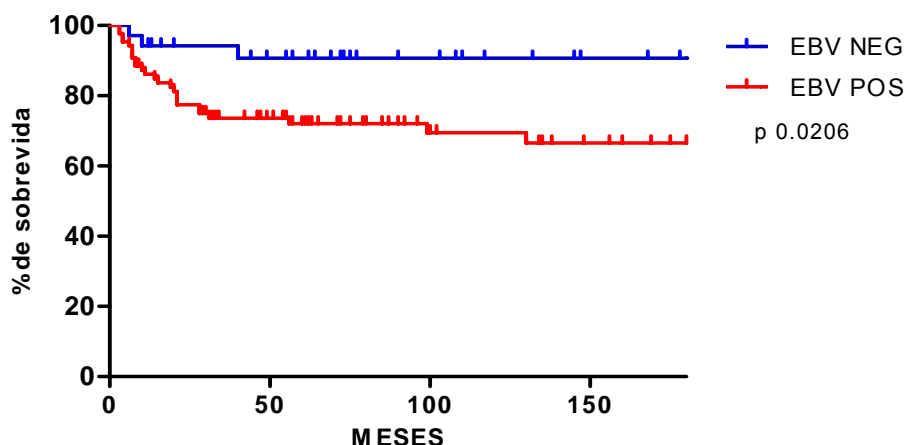


Figura 15 - Sobrevida global de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação ao status do EBV na faixa etária infanto-juvenil entre 0-15 anos (n=175).

Tabela 22 - Resumo das taxas de sobrevida dos 175 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (0-15 anos), em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 15 anos	
EBV negativo	n=51(29,1%)
Óbitos	n=3(5,9%)
Vivos	n=48(94,1%)
EBV positivo	n=124 (70,9%)
Óbitos	n=28(22,6%)
Vivos	n=96(77,4%)

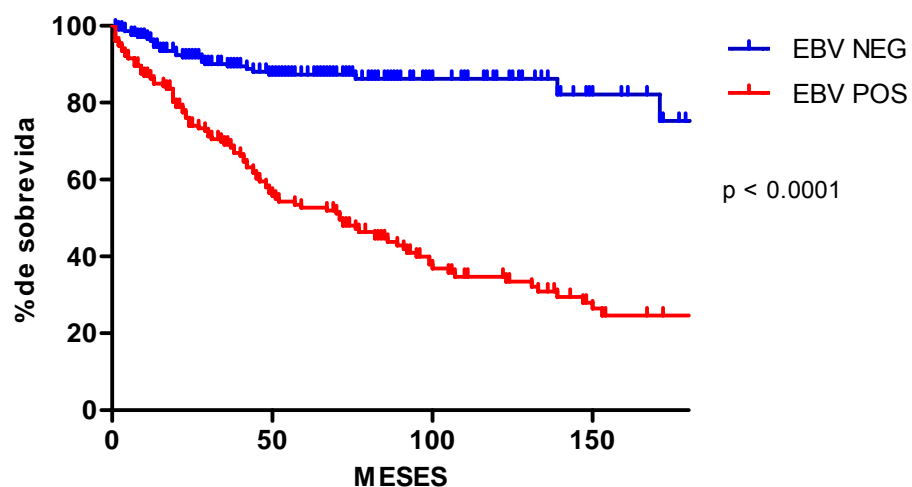


Figura 16 - Sobrevida global de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação ao status do EBV na faixa etária adulta entre 15,1 - 45 anos (n=499).

Tabela 23 - Resumo das taxas de sobrevida dos 499 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (15,1-45 anos), em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 30 anos	
EBV negativo	n=275(55,1%)
Óbitos	n=27(9,8%)
Vivos	n=248(90,2%)
EBV positivo	n=224(44,9%)
Óbitos	n=136(60,7%)
Vivos	n=88(39,3%)

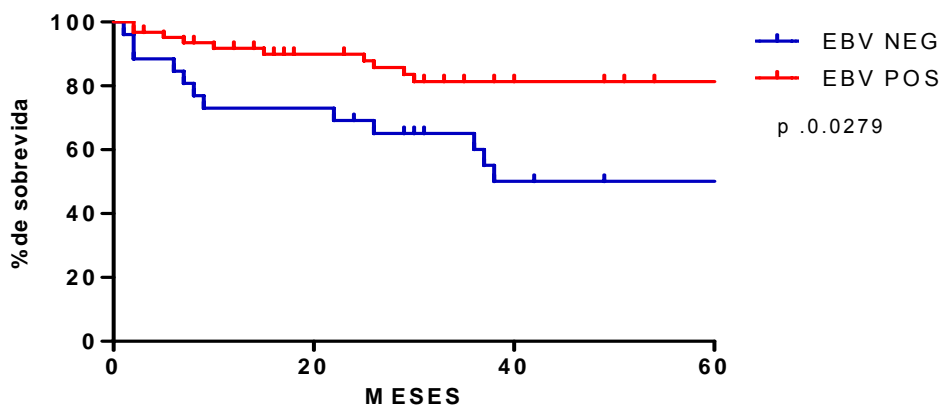


Figura 17 - Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico, em relação ao status do EBV na faixa etária adulta (> 45 anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV, MOPP-ABVD (n=90).

Tabela 24 – Resumo das taxas de sobrevivência dos 90 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico (>45 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV, MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevivência relativa (%), em 5 anos	
EBV neg	n=26(28,9%)
Óbitos	n=12(46,2%)
Vivos	n=14(53,8%)
EBV pos	n=64(71,1%)
Óbitos	n=15(23,4%)
Vivos	n=49(76,6%)

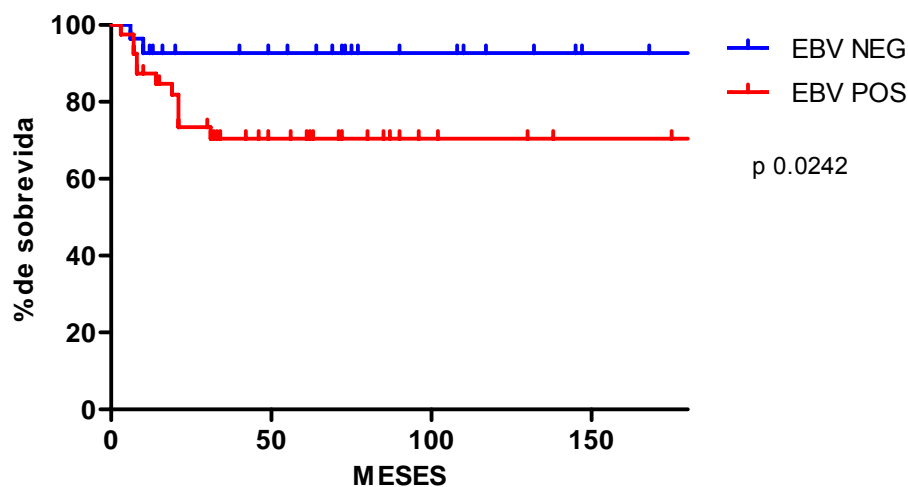


Figura 18 - Sobrevida global (SGD) de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa entre 0-15 anos (n=99).

Tabela 25 - Resumo das taxas de sobrevida dos 99 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (0-15 anos), em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 15 anos	
EBV negativo	n=39(39,4%)
Óbitos	N=2(5,1%)
Vivos	N=37(94,9%)
EBV positivo	n=60(60,6%)
Óbitos	N=13(21,7%)
Vivos	N=47(78,3%)

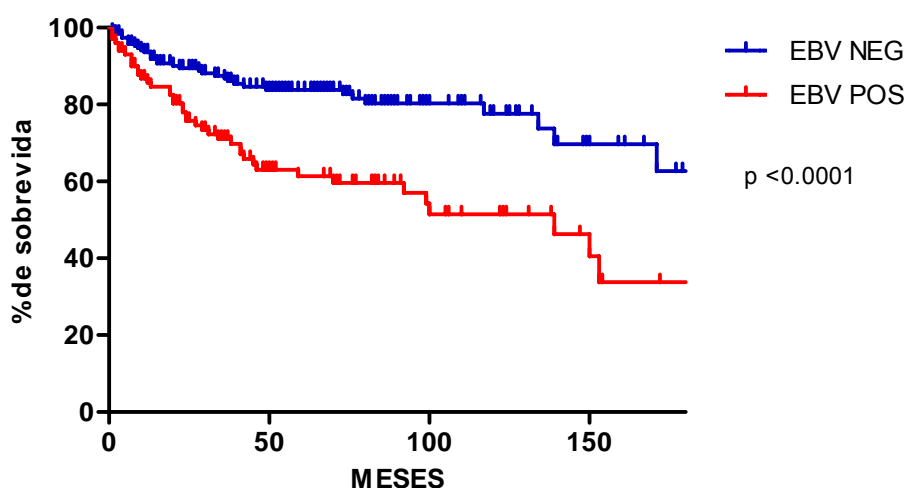


Figura 19 - Sobrevida global (SGD) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária entre 15,1 e 45 anos (n=390).

Tabela 26 - Resumo das taxas de sobrevida dos 390 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (15,1-45 anos), em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 15 anos	
EBV negativo	n=245(62,8%)
Óbitos	35(14,3%)
Vivos	210(85,7%)
EBV positivo	n=145(37,2%)
Óbitos	45(31%)
Vivos	100(69%)

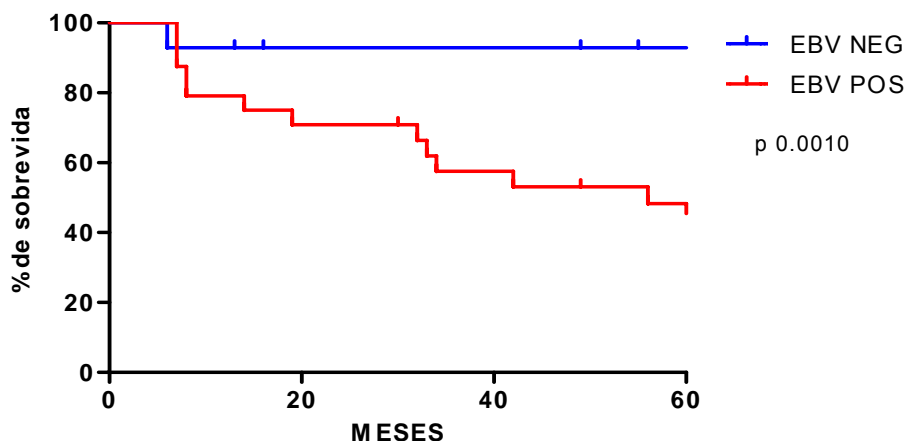


Figura 20 – Sobrevida de doença específica (SDE) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária infanto-juvenil (0-15anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD (n=41).

Tabela 27 - Resumo das taxas de sobrevivência dos 41 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (0-15 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevivência relativa (%), em 5 anos	
EBV negativo	n=16(39%)
Óbitos	n=1(6,3%)
Vivos	n=15(93,7%)
EBV positivo	n=25(61%)
Óbitos	n=20(80%)
Vivos	n=5(20%)

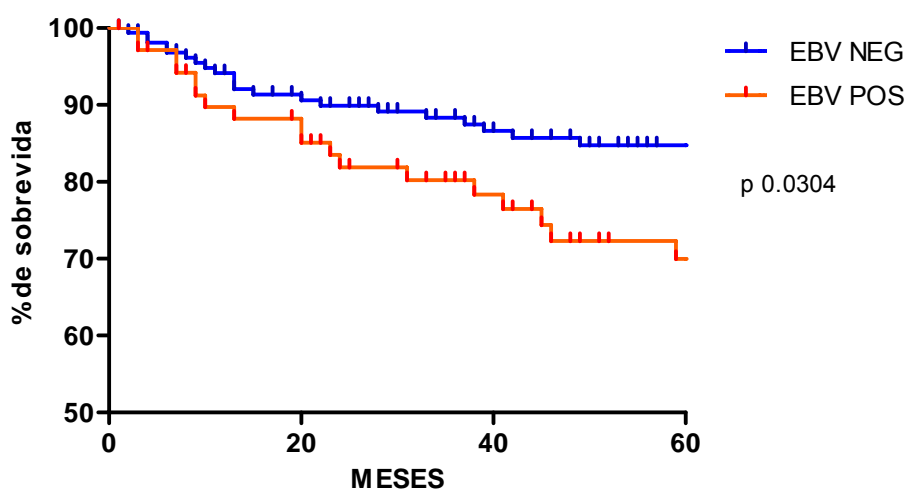


Figura 21 - Sobrevida de doença específica (SDE) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária adulta (15,1 - 45 anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD (n=238).

Tabela 28 – Resumo das taxas de sobrevida dos 238 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (15,1-45 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 5 anos	
EBV negativo	n=164(68,9%)
Óbitos	n=28(17,1%)
Vivos	n=136(82,9%)
EBV positivo	n=74(31,1%)
Óbitos	n=22(29,7%)
Vivos	n=52(70,3%)

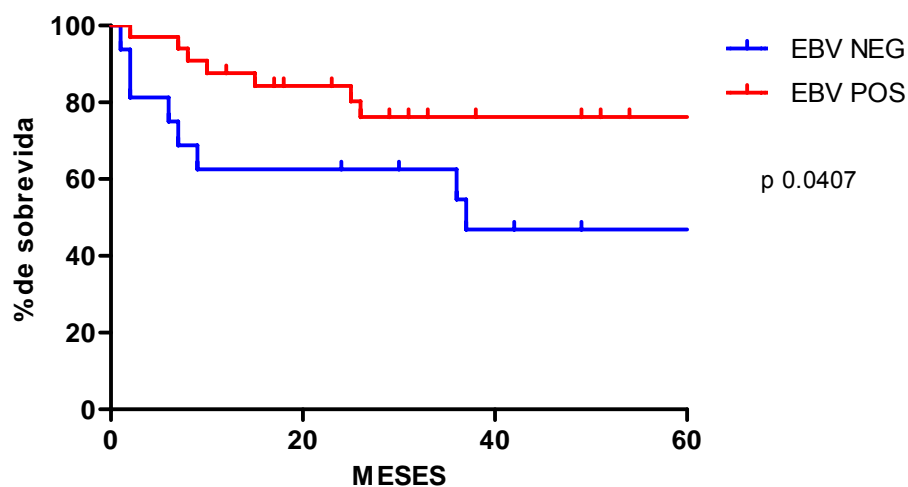


Figura 22 - Sobrevida de doença específica (SDE) de pacientes com linfomas de Hodgkin clássico Esclerose Nodular (ENOD), em relação ao status do EBV na faixa etária adulta (>45 anos). Esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD (n=50).

Tabela 29 - Resumo das taxas de sobrevivência dos 50 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico subtipo ENOD (>45 anos), que usaram esquemas ABVD, MOPP-ABV e MOPP-ABVD, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevivência relativa (%), em 5 anos	
EBV negativo	n=16 (32%)
Óbitos	n=8(50%)
Vivos	n=8(50%)
EBV positivo	n=34(68%)
Óbitos	n=7(20,6%)
Vivos	n=27(79,4%)

4.3 LINFOMAS NÃO HODGKIN E EPSTEIN BARR VIRUS

Dentre os 1624 LNH incluídos neste estudo, a maioria foi de células B (90,8%), dos quais 99,3%, de células B periféricas. Dentre eles, houve expressão do EBV em 10,8% dos casos (177/1624). Não houve positividade para EBV nos linfomas de células B ou T precursoras. Em linfomas T periféricos a prevalência do EBV foi de 22,5% (28/124), **Tabela 30**.

Os tipos de linfomas B periféricos com as maiores prevalências de EBV foram: Burkitt (58,3%), DGCB (8,8%) e folicular (8,6%). Dentre os linfomas T, as maiores prevalências de EBV foram: linfoma T/NK nasal (81,3%), linfomas T periféricos, sem outra especificação (24,4%) e linfoma T/NK, outros (30,8%), **Tabela 30**.

Dentre os linfomas com positividade para EBV mais baixa, temos: linfoma da zona marginal esplênica (1/28), linfoma da zona marginal extranodal (2/28), linfoma da zona marginal nodal (1/8) e linfoma de grandes células B do mediastino (1/32). Não houve expressão de EBV em linfomas linfocíticos (n= 51), de células do manto (n= 86) e de grandes células anaplásicas CD 30+ (n=50). Em linfomas sem imunofenotipagem definida para células B ou T, os quais representaram apenas 1,7% dos casos, houve positividade para EBV em 2/31 (6,4%; **Tabela 30**).

Os dados demográficos e clinicopatológicos dos LNH serão apresentados a seguir: a) o maior número de casos; b) a mais frequente associação com a expressão de EBV, aos menos frequentes: **Burkitt, LDGCB, Folicular e Linfomas T**.

Tabela 30 - Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma não-Hodgkin.

Não Hodgkin, Células B		EBV+	Não Hodgkin, Células T		EBV
	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)
Célula Precursora B			Célula Precursora T		
LLA-Linfoblástico	7(0,4)	0	Linfoblástico	10(7,5)	0
Células B Periféricas			Células T/NK Periférica		
LLC/Linfocítico	51(3,3)	0	T periférico SOE	45(36,2)	11(24,4)
Folicular	302(19,8)	26(8,6)	T/NK nasal	16(32)	13(81,3)
Manto/Manto blastóide	86(5,6)	0	GC anaplásicas, CD30+	50(40,3)	0
ZME	28(1,8)	1(3,6)	Outros linfomas T/NK periféricos	13(10,5)	4(30,8)
ZMEx	28(1,8)	2(7,1)			
ZMN	8(0,5)	1(12,5)	Total T periférica	124(92,5)	28(22,5)
Indolentes, outros	12(0,8)	6(50)			
Indolentes, N-CL	28(1,8)	2(7,1)			
DGCB SOE	839(55)	74(8,8)	Linfoma sem definição T ou B		
GCB mediastino	32(2,1)	1(3,1)	Célula precursora, LB	17(0,9)	0
Burkitt	108(7,1)	63(58,3)	Célula periférica, INCL	14(0,7)	2(14,3)
Agressivos B, outros	4(0,3)	1(25)			
Total células B periféricas	1624 (99,3)	177(10,8)	Total sem T/B; inclassificáveis	31(1,7)	2(6,4)
Total linfoma B	1634(90,8)	177(10,8)	Total linfoma T	134(7,4)	28(20,9)

***Linfomas:** **LLC/Linfocítico**=leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico; **ZME**=zona marginal esplênico; **ZMEx**=zona marginal extranodal; **ZMN**=zona marginal nodal; **LDGCB**=difuso de grandes células B; **GCB**=grandes células B; **GC**=grandes células; **LB**=linfoblástico; **N-CL**=linfomas inclassificáveis; **SOE**=sem outras especificações.

4.3.1 Linfoma de Burkitt

- **Dados demográficos e EBV**

Do total de 108 pacientes com linfoma de Burkitt avaliáveis para o EBV, 24 são femininos e 83 masculinos (1 paciente sem informação sobre gênero e idade). Na faixa etária infanto-juvenil (até 15 anos) há 87 pacientes e na de adultos 42 (acima de 15 anos). A etnia branca ocorre em 102 casos e não-branca em 6. A procedência é de 40 casos do Sul-Sudeste e 14 do Norte-Nordeste-Centro-Oeste (54 sem informação). O número de pacientes cujo diagnóstico foi feito nos períodos estudados foi: 1954-1979 (P1) 17 casos, 1980-1999 (P2) 57 casos e 2000-2008 (P3) 34 casos. Nenhum destes casos foi soropositivo para o HIV.

Dos 108 pacientes, 63 (58,3%) são positivos para EBV: 15 femininos (23,8%) e 48 masculinos (76,2%). Dos 63 casos EBV+, 56 estavam na faixa etária infanto-juvenil (88,9%) e 7 na faixa acima de 15 anos (11,1%); 23 do Sul-Sudeste e 8 do Norte-Nordeste-Centro-Oeste (32 sem informação); 9 indivíduos foram diagnosticados entre 1954-1979 (P1), 36 entre 1980-1999 (P2) casos e 18 entre 2000-2008 (P3).

A proporção de pacientes femininos positivos para EBV foi de 15/24 (62,5%) e de masculinos 48/83 (57,8%; $p=0.81$). A proporção dos pacientes EBV+ do Sul-Sudeste foi de 23/40 (57,5%) e dos pacientes das demais regiões 8/14 (57,1%; $p=1.0$). A proporção dos pacientes EBV+ diagnosticados no período P1 foi 9/17 (52,9%), no período P2 36/57 (63,1%) e no P3 18/34 (52,9%; $p=0.56$).

- **Dados clínicos e EBV**

A maioria dos pacientes com linfoma de Burkitt teve como perfil clínico doença avançada (72,2%), 47,2% com prognóstico mais favorável (IPI baixo risco ou intermediário baixo risco), e 39,8% menos favorável (IPI de intermediário alto e alto risco). A ausência de sintomas B (77,7%) foi predominante. Em relação a topografia tumoral destaca-se a região de abdome, com 63,9% de EBV+, em comparação com 19,4% para tumores da região de cabeça e pescoço ($p= 0.0455$). De forma resumida, todos os resultados do perfil clínico estão descritos na **Tabela 31**.

Em relação ao estágio *Ann Arbor* e grupos de risco clínico, houve frequências semelhantes para os de doença menos (60%) e mais avançada (64,1%), e com prognóstico favorável ou desfavorável, BR-IR= 58,7% Vs. IR-AR=53,5%, não havendo diferença significativa na análise dos grupos (EC, $p=1.0$; IPI, $p=0.8$).

A maioria dos pacientes estavam vivos (62,1%) e 45,4% sem evidência da doença (VSD) com alta prevalência viral (69,4%). Apenas 37% dos casos evoluíram para o óbito, e com menor frequência de EBV em relação aos VSD (57,5%).

Esses pacientes foram tratados, em sua maioria (59%) por protocolo Brasileiro para tratamento do câncer infantil (GBTL) e 22,2% utilizaram outros esquemas terapêuticos. A expressão de EBV nos pacientes tratados com protocolo GBTL foi de 61,1% (39/59) e 58,3% (14/24) para outros protocolos (**Tabela 31**).

O estudo de sobrevida específica (SDE) para pacientes que se trataram exclusivamente com protocolo brasileiro (GBTL N=59) não teve diferença significativa na análise ($p=0.32$). E, tampouco para pacientes que utilizaram outros esquemas ou que tinham pouca ou ausente informação clínica ($n=49$; $p=0.94$), **Tabela 31**.

O estudo entre os grupos etários mostrou alta prevalência viral 64,4% (56/87) para os pacientes da faixa etária infanto-juvenil (≤ 15 anos) e 33,3% nos adultos com idade >15 anos (7/21), com p valor significativo ($p=0.0134$). Resumidamente os resultados clínicos e de EBV dos grupos etários estão descritos na **Tabela 32**. O estudo de sobrevida global da doença (SGD) de pacientes com idade entre 0-15 anos ($n=87$), não mostrou diferenças em relação ao status do EBV ($p=0.15$; **Figura 23**; **Tabela 33**).

Pacientes infanto-juvenis ($n=67$) com doença avançada não tiveram associação de sobrevida e EBV ($p=0.19$). Não foi realizada análises para outros históricos clínicos, estadiamento ou prognóstico, devido à insuficiência de dados para o estudo.

Tabela 31 - Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma de Burkitt, em relação aos dados clínicos.

DADOS CLÍNICOS	N (%)	EBV+ (%)
TOPOGRAFIA		
Tumor abdominal	72 (66,6)	46 (63,9)
Tumor de cabeça e pescoço	21(19,4)	8(38,1)
[Linfonodos cervicais e anel de Waldeyer]	[12; 11,1%]	[3; 25,0%]
[Mandíbula e ossos]	[9; 8,3%]	[5; 55,6%]
Outros linfonodos	14(13,0)	8(57,1)
SD	1(0,9)	1(100)
ESTÁDIO CLÍNICO		
EC I-II	10(9,3)	6 (60,0)
EC III-IV	78(72,2)	50(64,1)
SD	20(18,5)	7(35,0)
SINTOMAS B		
Presente	10(9,3)	4(40,0)
Ausente	84(77,7)	55(65,5)
SD	14(12,9)	4(28,5)
IPI		
BR-IR	51(47,2)	37(58,7)
IR-AR	43(39,8)	23(53,5)
SD	14(1,1)	3(21,4)
EVOLUÇÃO CLÍNICA		
VIVOS	67(62,1)	39(58,2)
[VSD]	[49;45,4%]	[34;69,4%]
[VCD]	[18;16,7%]	[5;27,8%]
ÓBITOS	40(37,0)	23(57,5)
SD	1(0,9)	1(100)
TRATAMENTOS		
GBTL 1987 e 1996	59(54,6)	39(66,1)
Outros esquemas	24(22,2)	14(58,3)
SD	25(23,1)	10(40,0)
TOTAL	108(100)	63(58,3)

*SD=sem dados; Estádio clínico *Ann Arbor*: **EC I-II** doença menos avançada, **EC III-IV** doença mais avançada (EC III-IV); **IPI**=índice de prognóstico internacional, escalonado em **BR-IR**=baixo risco a intermediário baixo risco (0-2); **IR-AR**=intermediário alto à alto risco(>2); **VSD**=vivo sem doença; **VCD**=vivo com doença; **ÓBITOS**=MPD, mortos pela doença; **GBTL/LMB89** (Apêndice 2, Quadro 14).

Tabela 32 - Pacientes com linfoma de Burkitt, estratificados em grupos etários, em relação aos dados clínicos.

Categorias	0-15anos	EBV	>15anos	EBV
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
ESTÁDIO CLÍNICO				
I-II	9(10,3)	6(66,6)	1(4,8)	0(0)
III-IV	67(77,0)	46(68,7)	11(52,4)	4(36,4)
SD	11(12,6)	4(36,4)	9(42,3)	3(33,3)
IPI				
BR-IR	44(50,6)	33(75,0)	7(33,3)	4(57,1)
IR-AR	35(40,3)	21(60,0)	8(38,1)	2(25,0)
SD	8(9,2)	2(25,0)	6(28,6)	1(16,6)
SINTOMAS B				
Presente	5(5,7)	3(60,0)	5(23,8)	1(20,0)
Ausente	74(85,1)	51(69,0)	10(47,6)	4(40,0)
SD	8(9,2)	2(25,0)	6(28,6)	2(33,3)
EVOLUÇÃO CLÍNICA				
ÓBITOS	30(34,5)	18(60,0)	10(47,6)	5(50,0)
VIVOS	57(65,5)	38(66,6)	11(52,4)	2(18,2)
[VSD]	[47;54,0%]	[35; 74,5%]	[3; 14,3%]	[0; 0]
[VCD]	[10;11,5%]	[3; 30,0%]	[8; 38,1%]	[2; 25%]
TOTAL	87(80,5)	56(64,4%)	21(19,4)	7(33,3%)

(*) **EC**=estádio clínico Ann Arbor: **I-II** doença menos avançada; **III-IV** mais avançada; **IPI**=índice prognóstico internacional, **BR**= baixo risco a intermediário baixo risco (0-2); **IR-AR** intermediário alto a alto risco (>2), **VIVOS**: **VSD**=vivos sem doença; **VCD**=vivos com doença; **ÓBITOS**=MPD, mortos pela doença (Critérios clínicos, **Apêndice 2**).

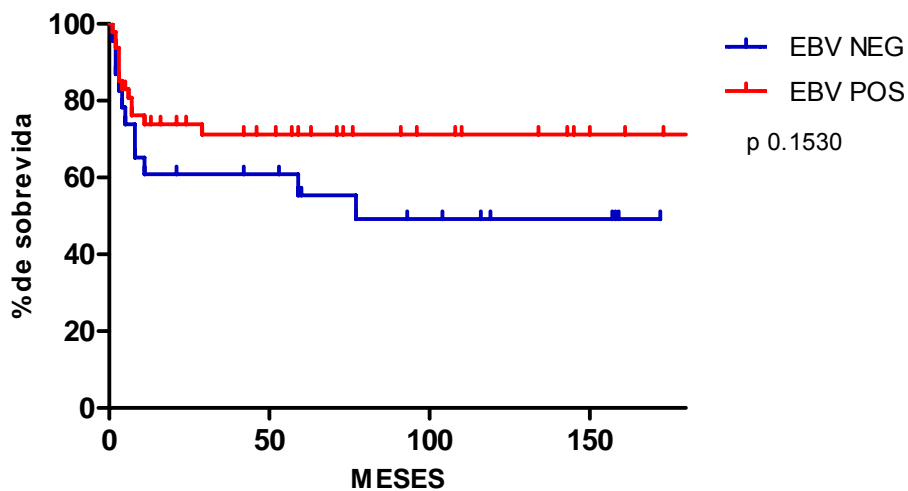


Figura 23 - Sobrevida global (SGD) de pacientes com linfoma de Burkitt, em relação ao status do EBV na faixa etária (0-15 anos), com seguimento clínico em 180m (n=87).

Tabela 33 - Resumo das taxas de sobrevivência de pacientes menores de 15 anos (n= 87) com linfoma de Burkitt, em relação à expressão de EBV

Taxa de sobrevivência relativa (%), em 15 anos.	
EBV negativo	n=31 (35,6%)
Óbitos	n=12(38,7%)
Vivos	n=19(61,3%)
EBV positivos	n=56(64,4%)
Óbitos	n=18 (32,1%)
Vivos	n=38(67,9%)

4.3.2 Linfoma Difuso de Grandes Células B

- **Dados demográficos e EBV**

Dos 921 pacientes com diagnóstico de Linfoma não Hodgkin Difuso de grandes células B (LDGCB) 839 foram estudados para a detecção de EBV, tendo-se 8,9% de perda de amostras na inserção tecidual em blocos de *Tissue Microarray* (n=92).

Dos 839 casos, 457 foram do gênero masculino (54,5%) e 382 do feminino (45,5%). A maioria pertencia à região sul-sudeste do país (64,1%; 538/839) e 142/839 (16,9%) às demais regiões agrupadas (N,NE,CO); pacientes procedentes de nações diferentes representaram apenas 5,4% (45/839) e sem dados documentados (13,6%; 114/839). A etnia branca prevaleceu em 87,7% (736/839) e a não-branca 12,3% (103/839).

O grupo etário infanto-juvenil representou 1,4% dos pacientes (12/839) e o adulto 98,6% (827/839). Entre os adultos, a maioria (53,6%) tinha idade entre 15,1 a 60 anos (n=450; mediana 58,6 anos) e 44,9% (n=377) com idade maior de 60 (mediana 64,1 anos). A maioria dos pacientes 50,4% (423/839) foi diagnosticada entre 2000-2008 (P3), 37,4% entre 1979-1999 (P2= 314/839) e 12,2% entre 1954-1979 (P1= 102/839).

Dos 839 pacientes 8,8% foram positivos para o EBV (74/839), com frequências semelhantes entre os gêneros masculino (8,8% ou 40/457) e feminino (8,9%, ou 34/382; p= 1,0). Dentre os indivíduos EBV+, 64/736 eram brancos (8,7%) e 10/103 (9,7%) de etnia não-branca (p=0.711). Em relação à procedência dos pacientes, 8,7% (47/538) vinham das regiões S-SE, 7,7% (11/142) das demais (N-NE-CO), 4,4% (2/45) de outras nações e para

12,3% (14/114) não constavam informações sobre procedência ($p= 0.8659$). Em relação ao período de diagnóstico encontraram-se 46/423 (10,9%) pacientes EBV+ em P3, 20/314 (6,4%) em P2 e 8/102 (7,8%) em P1 ($p=0.09$).

Pacientes com LDGCB menores de 15 anos tiveram maior frequência de expressão de EBV (33,3% ou 4/12), enquanto que nos acima dessa idade essa frequência foi de 8,4% (70/827; $p=0.016$). Deste último grupo, ao tomarmos os com idade de 15 a 60 anos, a prevalência de EBV foi de 43/450 (9,5%) e os com 60 anos ou mais, 7,2% (27/377; $p= 0.259$).

- **Dados clínicos e EBV**

Os LNH apresentaram-se preferencialmente na topografia da cabeça e pescoço (62%), seguida pelo abdome (16,2%), pélvis (10,3%) e tórax/mediastino (4,6%). Outras localizações primárias, como osso, sistema nervoso central, pele e tecidos moles, corresponderam a 6,9% dos casos. Doença avançada esteve presente em 462 pacientes (55,1%), ausência de sintomas B em 445 (53%) e IPI favorável em 512 casos (61,1%). Dos pacientes vivos (52,1%; $n=437$) apenas 26,7% foram considerados livres de doença (VSD =224) ao último retorno clínico, e 47,2% ($n=396$) mortos pela doença. Não houve associação entre a expressão de EBV e estágio avançado da doença, sintomas B, IPI e topografia do diagnóstico tumoral (**Tabela 34**).

A avaliação da evolução clínica dependeu de 65,1% ($n=546$) dos pacientes que foram tratados com quimio- e radioterapia, sendo poucos os

casos que realizaram esses tratamentos de forma isolada (2% somente QT e 0,6% RT; **Tabela 34**).

O esquema CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona) para o tratamento de linfomas B periféricos foi utilizado em 31% dos pacientes (261/839). Outros esquemas foram menos frequentes, com adição de bleomicina em 6,1% dos casos e Rituximabe em 7,4%. Diversos outros esquemas terapêuticos, infrequentes ou heterogêneos, foram utilizados em 22,5% dos pacientes com linfoma DGCB (189/839; **Tabela 34**).

A análise da sobrevida global dos 839 pacientes com LDGCB não mostrou influência quanto ao status do EBV ($p=0.3274$). O mesmo ocorreu quando a análise foi feita para aqueles que utilizaram esquema CHOP ($n=261$; $p=0.4926$), CHOP-BLEO ou Bleomicina ($n=51$; $p=0.5319$) e CHOP-R ou Rituximab/CHOP-BLEO ($n=113$; $p=0.6347$; **Figuras 24 e 25; Tabelas 35 e 36**).

Os dados referentes ao grupo de pacientes adultos dividido nos subgrupo de adultos jovens (15-60 anos) e adultos maduros (acima de 60 anos) são mostrados na **Tabela 37**. A frequência de EBV foi maior para a idade mais jovem (10,2%) e menor nos mais velhos (6,8%). Não houve diferença no estudo para os critérios clínicos, entre os grupos etários. A análise de SGD não mostrou associação ao EBV AD-J ($p=0.3946$, $n=450$) e maduros ($p=0.8952$, $n=377$) ou para o uso do esquema CHOP/SDE, adultos jovens ($p=0.6278$), e maduros ($p=0.8697$).

Tabela 34 - Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma DGCB, em relação aos dados clínicos.

DADOS CLÍNICOS	N (%)	EBV+ (%)
TOPOGRAFIA		
Tumor de cabeça e pescoço	520(62,0)	47(9,0)
Tumor torácico e de mediastino	39(4,6)	4(10,3)
Tumor abdominal	136(16,2)	11(8,1)
Tumor pélvico	86(10,3)	8(9,3)
Outros	58(6,9)	4(6,9)
ESTÁDIO CLÍNICO		
EC I-II	242(28,8)	18(7,4)
EC III-IV	462(55,1)	42(9,1)
SD	135(16,1)	14(10,4)
SINTOMAS B		
Presente	300(35,8)	26(8,7)
Ausente	445(53,0)	39(8,8)
SD	94(11,2)	9(9,6)
IPI		
BR-IR	512(61,1)	44 (8,6)
IR-AR	163(19,4)	11(6,8)
SD	164(19,5)	19(11,6)
EVOLUÇÃO CLÍNICA		
OBITOS	402(47,9)	33(8,2)
[MPD]	396(47,2)	33(8,3)
[MPC]	6(0,7)	0(0)
VIVOS	437(52,1)	41(9,4)
[VSD]	[224;26,7%]	[26;11,6%]
[VCD]	[213;25,4%]	[15;7,0%]
TRATAMENTOS		
Somente QT	17(2,0)	0(0)
Somente RT	5(0,6)	0(0)
Com QT+RT	546(65,1)	44(8,1)
SD	281(33,5)	30(10,7)
Esquema CHOP	261(31,0)	20(7,7)
Esquema CHOP-BLEO	51(6,1)	6(11,8)
Esquema CHOP-R	62(7,4)	3(4,8)
Outros esquemas	189(22,5)	15(7,9)
SD para QT	276(33,0)	30(10,9)
TOTAL	839 (100)	74(8,8)

*SD=sem dados; Estádio clínico *Ann Arbor*: **EC I-II** doença menos avançada, **EC III-IV** doença mais avançada (EC III-IV); **IPI**=índice de prognóstico internacional, escalonado em **BR**=baixo risco 0-2 (incluído **IR**=risco intermediário baixo) e **AR**=alto risco >2 (incluído intermediário alto): **Apêndice 3, Quadro 11 e 12**; **VSD**= vivo sem doença; **VCD**=vivo com doença; **MPD**=morto pela doença; **MPC**=morto por outra causa;**CHOP/CHOP-R**, esquemas terapêuticos (Critérios clínicos e terapêuticos, Apêndice 2).

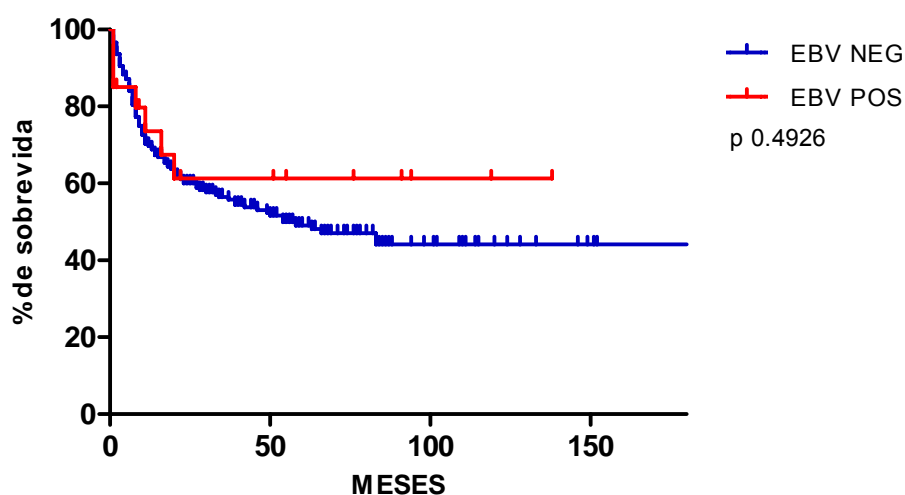


Figura 24 - Sobrevida doença específica (SDE) de pacientes com linfoma DGCB que usaram o esquema CHOP, em seguimento clínico de 180m (n=261).

Tabela 35 - Resumo das taxas de sobrevida dos 261 pacientes com linfoma DGCB que usaram esquema CHOP, em relação à expressão de EBV

Taxa de sobrevida relativa (%), em 15 anos.	
EBV negativo	n=241 (92,3%)
Óbitos	n=113(46,9%)
Vivos	n=128(53,1%)
EBV positivo	n=20(7,7%)
Óbitos	n=7 (35,0%)
Vivos	n=13(65,0%)

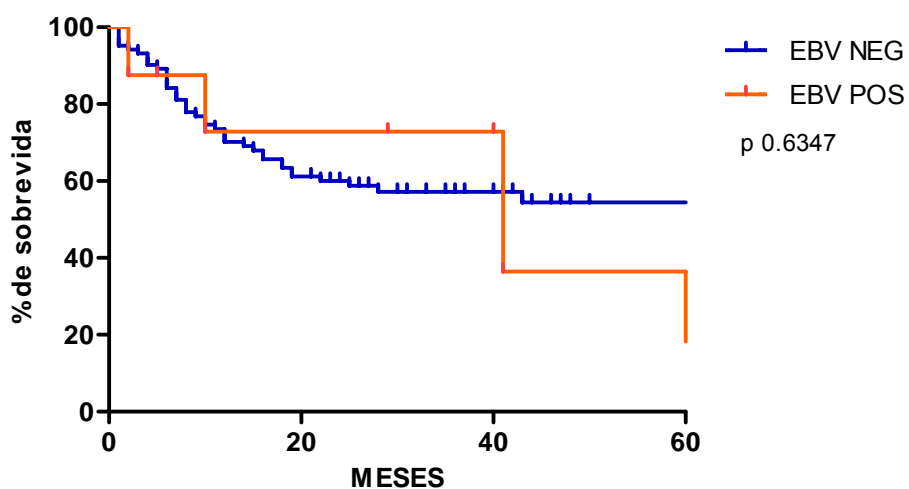


Figura 25 - Sobrevida de doença específica (SDE) de pacientes com linfoma DGCB que usaram os esquemas CHOP-R e CHOP-BLEO, com seguimento clínico de 60m (n=113).

Tabela 36 - Resumo das taxas de sobrevivência dos 113 pacientes com linfoma DGCB que usaram esquemas CHOP-R e CHOP-BLEO, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevivência relativa (%), em 5 anos.	
EBV negativo	n=104 (92,0%)
Óbitos	n=47(45,2%)
Vivos	n=57(54,8%)
EBV positivo	n=9 (8,0%)
Óbitos	n=5 (55,6%)
Vivos	n=4 (44,4%)

Tabela 37 - Pacientes adultos com linfoma DGCB, dados clínicos e EBV.

CATEGORIAS	ADULTO JOVEM		ADULTO MADURO	
	N(%)	EBV(%)	N(%)	EBV(%)
ESTÁDIO CLÍNICO				
EC I-II	116(26,2)	8(6,9)	121(32,1)	9(7,4)
EC III-IV	265(58,8)	27(10,2)	191(50,7)	13(6,8)
SD	69(15,3)	8(11,5)	65(17,2)	5(7,7)
IPI				
BR-IR	297(66,0)	28(9,4)	214(63,9)	15(7,0)
IR-AR	78(17,3)	6(7,7)	81(22,0)	5(6,2)
SD	75(16,6)	9(12,0)	110(29,2)	7(6,3)
SINTOMAS B				
Presença	167(37,1)	17(10,2)	131(34,7)	9(6,9)
Ausência	232(51,5)	21(9,1)	206(54,6)	17(8,3)
SD	51(11,3)	5(9,8)	40(10,6)	1(2,5)
EVOLUÇÃO CLÍNICA				
ÓBITOS	220(48,8)	20(9,1)	178(47,2)	13(7,3)
[MPD]	[218;48,4%]	[20;9,2%]	[174;46,2%]	[13;7,5%]
[MPC]	[2;0,4%]	[0;0]	[4;1,1%]	[0]
VIVOS	230(51,1)	23(10,0)	199(52,8)	14(7,0)
[VSD]	[120;26,6%]	[13;10,8%]	[98;26,0%]	[10;10,2%]
[VCD]	[110;24,4%]	[10;9,1%]	[101;26,8%]	[4;3,9%]
Total	450(100)	43(9,5)	377(100)	27(7,2)

*SD=sem dados; EBV=Epstein Barr vírus; Estádio clínico *Ann Arbor*. EC I-II doença menos avançada, EC III-IV doença mais avançada (EC III-IV); IPI=índice de prognóstico internacional, BR=baixo risco 0-2 (incluído IR-BR=risco intermediário baixo) e AR=alto risco >2 (incluído IR-AR=risco intermediário alto); VSD= vivo sem doença; VCD=vivo com doença; MPD=Mortos pela doença; MPC=mortos por outra causa (critérios clínicos Apêndice 2).

4.3.3 Linfoma Folicular

- **Dados demográficos e EBV**

Do total de 309 pacientes elegíveis no estudo, houve perda de 2,2% de casos na inclusão tecidual tumoral em blocos de *Tissue Microarray* (n=7), sendo avaliados 302 pacientes para a detecção viral. Destes, 41,7% são masculinos (126/302) e 53,6% femininos (162/302), com 14 casos sem informação documental adequada. O grupo étnico branco foi predominante com 85,1% (257/302), 7,9% não brancos (24/302), e 21 pacientes sem informação sobre a etnia. Em sua maioria (64%) tiveram origem da região sul-sudeste do país (n=193), com menor frequência (17,5%; n=53) para pacientes originados das regiões geográficas agrupadas N-NE-CO, e de outras nações (4,6%; n=14) ou sem informações (12,5%; n=38).

Os adultos predominam no tipo histológico (95%), sendo observado um caso infantil e 14 sem dados de idade nos documentos avaliados. Os adultos mais jovens (15,1 a 60 anos) representaram 50% dos casos (151/302) e 44,4% (136/302) adultos mais maduros (>60 anos). A maioria dos pacientes foram diagnosticados em períodos mais recentes: 48,7% em P3 (2000-2008; n=147), 43,7% em P2 (1980-1999; n=132) e 7,6% em P1 (1954-1979; n=23).

Em relação ao EBV 8,6% (26/302) dos pacientes com linfoma folicular expressaram o vírus. A frequência de EBV foi semelhante quanto ao grau histológico 1, 2 e 3, e levemente aumentado para o de maior grau, respectivamente, 8,5% (5/59), 8,3% (11/133) e 8,8% (5/57). Apenas 18% dos casos (53/302) não foram classificados quanto ao grau histológico, e

destes, 9,4% (5/53) foram positivos ao EBV. Em homens a frequência de EBV foi maior (12,7%; 16/126) e menor em mulheres (6,2%; 10/162); não houve expressão de EBV nos 14 casos sem identificação do gênero. Não houve significância estatística para a distribuição de EBV entre os linfomas foliculares e os de gêneros ($p=0.064$).

Entre os grupos étnicos as frequências de EBV foram semelhantes, em brancos 8,6% (22/257) e não brancos 8,3% (2/24); houve 9,5% (2/21) de positividade em pacientes sem dados de etnia. A prevalência viral foi de 13,2% (7/53) para os procedentes das regiões N-NE-CO e de 8,8% (17/193) para os das regiões S-SE; 5,3% (2/38) de positividade ocorreu em pacientes sem identificação de procedência. Não houve expressão de EBV nos 18 pacientes de outras nações. Não houve associação quanto à expressão de EBV da etnia ($p=1.0$) e procedência geográfica ($p=0.4314$).

Indivíduos adultos corresponderam a 95% (287/302) dos casos de linfoma folicular, sendo a expressão de EBV exclusiva nesta faixa etária. Nos adultos mais jovens (15,1-60 anos) foram EBV+ 7,9% dos casos (12/151) e em adultos mais velhos (>60 anos), 10,3% (14/136; $p=0.5405$).

Quanto ao período de diagnóstico, os casos EBV+ foram assim distribuídos: nenhum caso em P1 (1954-1979; $n=23$), 12,1% de casos em P2 (1980-1999; 16/132) e 6,8% dos casos em P3 (2000-2008; 10/147; $p=0.1507$).

- **Dados clínicos e EBV**

Os dados clínicos e EBV dos pacientes adultos (n=287) são descritos resumidamente na **Tabela 38**. O sítio primário ao diagnóstico incluiu: cabeça e pescoço (48,1%), pélvis (18,5%), tórax/mediastino (16,4%), abdomen (8,0%) e outros/informação ausente (9,1%).

A maioria dos pacientes clinicamente apresentaram doença avançada (59,6%; 171/287) em relação a estádios I-II (19,5%; 56/287). Em 55,7% dos casos não havia sintomas B (160/287) e para 28,6% (82/287) estes estavam presentes. E, 206/287 pacientes estavam com baixos índices prognósticos (71,7%) e 12,5% estavam com índices altos (36/287). Em relação à evolução, dos 66,5% (191/287) dos pacientes vivos no último retorno, 90 (33,8%) não apresentavam sinais de doença. O número de óbitos foi de 96 (33,4%), havendo informe de óbito pela doença em 93% dos casos (93/287; **Tabela 38**).

A maioria dos pacientes com linfoma folicular realizou apenas quimioterapia 49,1% (141/287) e 21,3% (61/287) combinada a radioterapia. Apenas 1% (3/287) fez radioterapia isolada e de 28,6% não havia informações (82/287). O esquema mais utilizado foi o CHOP (23,3%; 67/287), seguido pelo COP (19,8%; 57/287), CHOP/Bleomicina (4,2%; 12/287) e Rituximab/CHOP (6,3%; 18/287). Outros esquemas e combinações foram utilizados por 18,8% (54/287) dos pacientes (**Tabela 38**).

Em relação à expressão de EBV (9,1%; 26/287) nas diferentes topografias de diagnóstico, temos: cabeça e pescoço 10/138 (7,3%), pélvis

6/53 (11,3%), tórax/mediastino 3/47 (6,4%), abdomen 3/23 (13%) e outras localizações 4/26 (15,4%; $p=0.6339$). Quanto ao estágio, no grupo I-II a frequência de EBV+ foi 3/56 (5,4%) e no grupo III-IV 16/171 (9,4%; $p=0.4162$). Dos que apresentaram sintomas B, 9/82 (11%) foram EBV+ e no caso contrário 10/160 (17,9%; $p=0.2129$). Dos pacientes com índices prognósticos mais favoráveis, 14/206 (6,8%) foram EBV+ e com menos favoráveis 5/36 (13,8%; $p=0.1732$). Dos pacientes vivos no último retorno, 16/191 (8,4%) eram EBV+ e dos que evoluíram a óbito 10/96 (10,4%; **Tabela 38**).

O estudo de sobrevida global dos pacientes adultos ($n=287$) não teve associação significativa com o status do EBV ($p= 0.08$; **Tabela 39**; **Figura 26**).

Tabela 38 - Frequência da expressão de EBV nos pacientes adultos com linfoma de Folicular, em relação aos dados clínicos.

DADOS CLÍNICOS	N (%)	EBV+ (%)
TOPOGRAFIA		
Tumor de cabeça e pescoço	138(48,1)	10(7,3)
Tumor torácico e de mediastino	47(16,4)	3(6,4)
Tumor abdominal	23(8,0)	3(13,0)
Tumor pélvico	53(18,5)	6(11,3)
Outros	26(9,1)	4(15,4)
ESTÁDIO CLÍNICO		
EC I-II	56(19,5)	3(5,4)
EC III-IV	171(59,6)	16(9,4)
SD	60(20,9)	7(11,6)
SINTOMAS B		
Presente	82(28,6)	9(11,0)
Ausente	160(55,7)	10(17,9)
SD	45(15,7)	7(15,5)
IPI		
BR-IR	206(71,7)	14(6,8)
IR-AR	36(12,5)	5(13,8)
SD	45(15,7)	7(15,5)
EVOLUÇÃO CLÍNICA		
ÓBITOS	96(33,4)	10(10,4)
[MPD]	[93;32,4%]	[10;10,7%]
[MPC]	[3;1,0%]	[0;0]
VIVOS	191(66,5)	16(8,4)
[VSD]	[97; 33,8%]	[5; 5,2%]
[VCD]	[94; 32,8%]	[11;11,7%]
TRATAMENTOS		
Somente QT	141(49,1)	8(5,6)
Somente RT	3(1,0)	0
Com QT+RT	61(21,3)	9(14,8)
SD	82(28,6)	9(10,9)
Esquema CHOP	68(23,3)	8(11,8)
Esquema CHOP-BLEO	12(4,2)	1(8,3)
Esquema CHOP-R	18(6,3)	1(5,5)
Esquema COP	57(19,8)	4(7,0)
Outros esquemas	53(18,5)	3(5,6)
SD para QT	79(27,5)	9(11,3)
TOTAL	287 (100)	26(9,1)

*SD=sem dados;Estádio clínico *Ann Arbor*. **EC I-II** doença menos avançada, **EC III-IV** doença mais avançada (EC III-IV); **IPI**=índice de prognóstico internacional, escalonado em **BR**=baixo risco 0-2 (incluido **IR**=risco intermediário baixo) e **AR**=alto risco >2 (incluido intermediário alto); **VSD**= vivo sem doença; **VCD**=vivo com doença; **MPD**=morto pela doença; **MPC**=morto por outra causa; **COP/CHOP/CHOP-R**, esquemas terapêuticos (Apêndice 2).

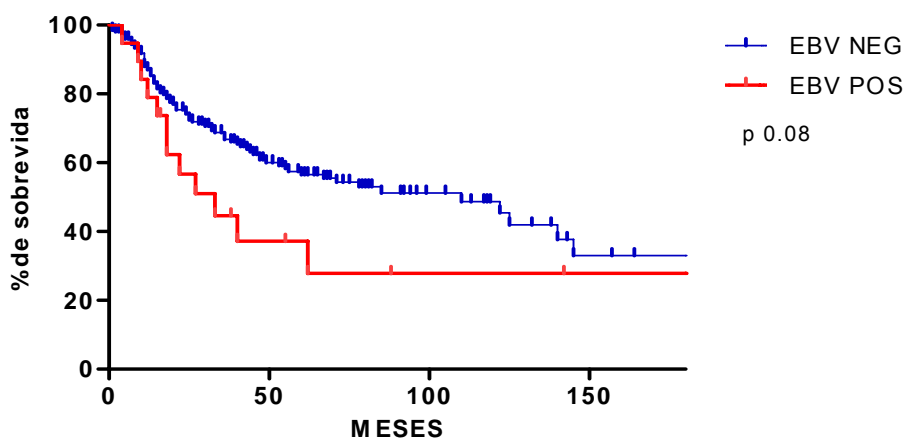


Figura 26 - Sobrevida global (SGD) de pacientes adultos com linfoma Folicular, em seguimento clínico de 180m (n=287).

Tabela 39 - Resumo das taxas de sobrevida dos 287 pacientes com linfoma folicular, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 15 anos.	
EBV negativo	n=261 (90,9%)
Óbitos	n=86(32,9%)
Vivos	n=175(67,1%)
EBV positivo	n=26 (9,1%)
Óbitos	n=14 (53,8%)
Vivos	n=12 (46,2%)

Quando a sobrevida dos pacientes adultos que utilizaram somente o esquema CHOP foi analisada em relação ao status do EBV (11,8%; 8/68), houve diferença significativamente menos favorável para os EBV+ ($p=0.003$; **Tabela 40; Figura 27**).

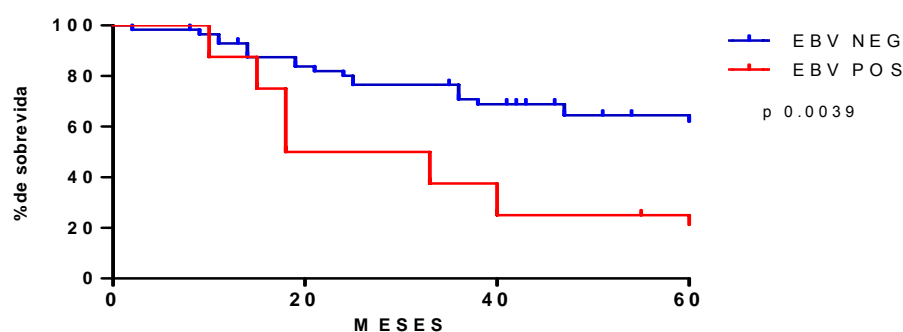


Figura 27 - Sobrevida de doença específica (SDE) de pacientes adultos com linfoma Folicular que usaram o esquema CHOP, em seguimento clínico de 60m (n=68).

Tabela 40 - Resumo das taxas de sobrevida dos 68 pacientes com linfoma folicular que usaram o esquema CHOP, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 5 anos.	
EBV negativo	n=60 (88,2%)
Óbitos	n=25(41,7%)
Vivos	n=35(58,3%)
EBV positivo	n=8 (11,8%)
Óbitos	n=7 (87,5%)
Vivos	n=1 (12,5%)

Na estratificação etária em adultos, os mais jovens (AD-J 15,1-60anos, n=151) e maduros (AD-M >60anos) apresentaram doença mais avançada (estádios III-IV), respectivamente em 31,8% e 61% dos casos. O índice prognóstico mais favorável ocorreu, respectivamente, em 72,2% e 71,3% dos casos. Os sintomas B estiveram ausentes, respectivamente, em 53,1% e 58,8% dos casos (**Tabela 41**). No último retorno clínico, dos 74,2% AD-J, metade estava com e outra metade livre de neoplasia.

Em relação ao status do EBV, os AD-J tiveram 10,3% de positividade e os AD-M 7,9% ($p=0.5405$; **Tabela 41**). Dentre os pacientes com doença mais avançada (estádios III-IV) a prevalência do EBV foi 8,3% (4/48) nos AD-J e 10,8% (9/83) nos AD-M ($p=0.7674$). Dentre os pacientes com sintomas B, 6,8% dos AD-J eram EBV+ contra 15,8% dos AD-M ($p=0.2907$). Dentre aqueles sem sintomas B, 5% dos AD-J e 7,5% dos AD-M eram EBV+ ($p=0.5314$). As frequências de EBV+ entre os AD-J com índices prognósticos mais e menos favoráveis foram 4,6% e 14,3%, respectivamente. Entre os AD-M, estas frequências foram de 9,3% e 14,3%, respectivamente ($p=0.2674$; **Tabela 41**).

A análise de sobrevida global dos pacientes adultos mais jovens ou maduros, segundo o status do EBV, seguidos por 15 anos, não se mostrou diferente ($p=0.69$ e 0.54 , respectivamente). Tampouco houve significância quando avaliados os pacientes AD-M, segundo o índice de prognóstico mais favorável e o status do EBV ($p=0.432$). Entretanto, em pacientes AD-J foi demonstrada sobrevida desfavorável para os EBV+ nos casos de índice de prognóstico mais favorável ($p=0.04$; **Tabela 42; Figura 28**).

Tabela 41 - Pacientes adultos com linfoma folicular: dados clínicos e EBV, segundo a faixa etária com corte em 60 anos.

CATEGORIAS	15,1-60 anos		> 60 anos	
	N(%)	EBV(%)	N(%)	EBV(%)
ESTÁDIO CLÍNICO				
EC I-II	27(17,9)	0(0)	29(21,3)	3(10,3)
EC III-IV	48(31,8)	4(8,3)	83(61,0)	9(10,8)
SD	76(50,3)	8(10,5)	24(17,6)	2(8,3)
IPI				
BR-IR	109(72,2)	5(4,6)	97(71,3)	9(9,3)
IR-AR	14(9,3)	2(14,3)	21(15,4)	3(14,3)
SD	28(18,5)	7(25)	18(13,2)	2(11,1)
SINTOMAS B				
Presença	44(29,1)	3(6,8)	38(27,9)	6(15,8)
Ausência	80(53,1)	4(5,0)	80(58,8)	6(7,5)
SD	27(17,8)	5(18,5)	18(13,2)	2(11,1)
EVOLUÇÃO CLÍNICA				
ÓBITOS	39(25,8)	3(7,6)	55(40,4)	7(12,7)
[MPD]	[38(15,2)]	[3(7,8)]	[53(38,9)]	[7(13,2)]
[MPC]	[1(0,6)]	[0(0)]	[2(5,5)]	[0(0)]
VIVOS	112(74,2)	9(8,0)	81(59,5)	7(8,6)
[VSD]	[56(37,1)]	[3(5,3)]	[43(31,6)]	[2(4,6)]
[VCD]	[56(37,1)]	[6(10,7)]	[38(27,9)]	[5(13,1)]
Total	151	12(7,9)	136	14(10,3)

*SD=sem dados; EBV=Epstein Barr vírus; Estádio clínico *Ann Arbor*: EC I-II doença menos avançada, EC III-IV doença mais avançada (EC III-IV); IPI=índice de prognóstico internacional, BR=baixo risco 0-2 (incluído IR-BR=risco intermediário baixo) e AR=alto risco >2 (incluído IR-AR=risco intermediário alto); VSD= vivo sem doença; VCD=vivo com doença; MPD=Mortos pela doença; MPC=mortos por outra causa (critérios clínicos, Apêndice 2).

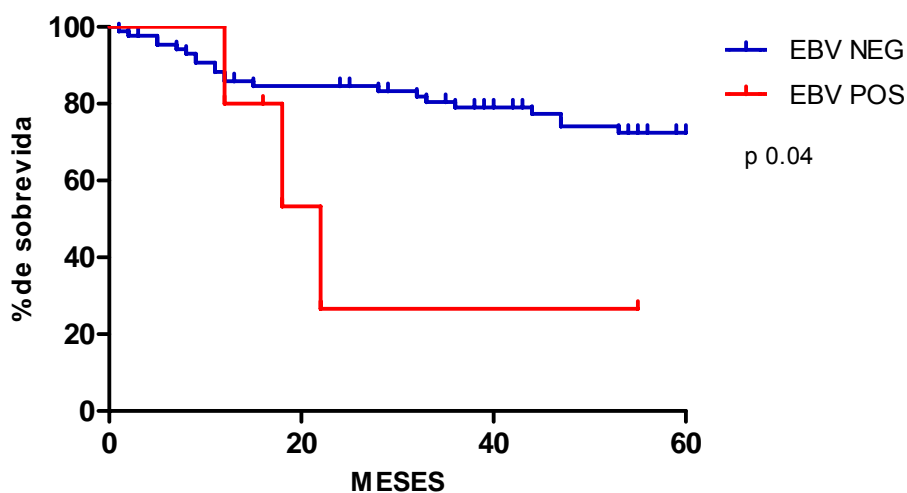


Figura 28 - Sobrevida global de pacientes adultos mais jovens (15,1 a 60 anos) com linfoma folicular e IPI baixo + intermediário, em seguimento clínico de 60m (n=109), segundo o status de EBV.

Tabela 42 - Resumo das taxas de sobrevida dos 109 pacientes com linfoma folicular (15,1-60 anos), com índices prognósticos mais favoráveis, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 5 anos.	
EBV negativo	n=104 (95,4%)
Óbitos	n=29(27,8%)
Vivos	n=75(72,2%)
EBV positivo	n=5 (4,6%)
Óbitos	n=3 (60%)
Vivos	n=2 (40%)

Se considerarmos ambos os grupos adultos juntos (> 15 anos) com índice prognóstico mais favorável (n=206), há significativa diferença na sobrevida global de 5 anos, desfavorecendo os EBV+ (p=0.01; **Tabela 43**; **Figura 29**).

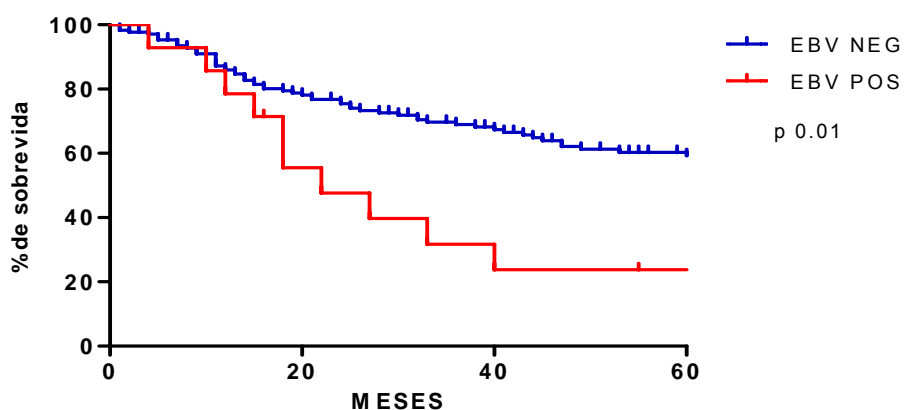


Figura 29 - Sobrevida global de pacientes, todos os adultos com linfoma folicular e índice de prognóstico (0-2), com seguimento clínico de 60 m (n=206).

Tabela 43 - Resumo das taxas de sobrevida dos 206 pacientes com linfoma folicular (>15 anos), com índices prognósticos mais favoráveis, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 5 anos.	
EBV negativo	n=192 (93,2%)
Óbitos	n=70(36,4%)
Vivos	n=122(63,6%)
EBV positivo	n=14 (6,8%)
Óbitos	n=10 (71,4%)
Vivos	n=4 (28,6%)

4.3.4 Linfomas T

- **Dados demográficos e EBV**

Dos 126 casos de linfomas T/NK periféricos, 124 foram avaliáveis para EBV. Destes, 53 (42,7%) eram de tipos específicos reconhecidamente negativos para EBV e foram excluídos da descrição mais detalhada abaixo: 50 do tipo grandes células anaplásicas CD30+, um hepatoesplênico e dois linfomas/leucemias T do adulto, relacionados ao HTLV1. Todos esses casos foram, de fato, negativos para EBV. Dentre os 71 casos restantes (57,3%), a maior parte correspondeu aos linfomas T periféricos SOE (63,3%; 45/71). Os outros tipos corresponderam a linfomas T/NK do tipo nasal (22,5%; 16/71) e T-angioimunoblástico (14,1%; 10/71).

A maioria dos 71 pacientes com linfoma T/NK periféricos eram adultos (>15 anos: 95,7%; 68/71). Destes, os adultos jovens (15-60 anos) compreenderam 69,1% dos casos (47/68) e os maduros (> 60 anos) 30,9% (21/68). A etnia branca é predominante (90,1%; 64/71), e os não brancos foram 9,8% (7/71). Em relação ao gênero, o masculino representa 78,9% dos casos (56/71) e o feminino 21,1% (15/71). Estes pacientes procederam, em sua maioria, da região sul-sudeste do país 66,2% (47/71), sendo 9,8% de outras regiões agrupadas (N-NE-CO; 7/71) e 23,9% sem dados sobre a procedência (17/71). A distribuição dos diagnósticos nos três períodos estudados foi de 16 casos cada (22,5%) nos períodos P1 (1954-1979) e P2 (1980-1999) e de 39 casos (54,9%) em P3 (2000-2008).

Dentre esses 71 casos a frequência de EBV foi de 39,4% (28/71), sendo em brancos 37,5% (24/64) e 57,1% em não brancos (4/7). Nos gêneros a frequência de positividade para EBV foi menor para homens (33,9%; 19/56) que para mulheres (60%; 9/15). Quanto à procedência, 36,2% dos casos positivos (17/47) eram do sul-sudeste, 28,6% (2/7) das outras regiões agrupadas (N-NE-CO) e 52,9% sem dados sobre a procedência (9/17).

No grupo infanto-juvenil (< 15 anos), 2 de 3 pacientes com linfoma T/NK periférico foi positivo para o EBV. Nos adultos jovens (15-60 anos) a frequência de EBV foi de 32% (15/47) e nos adultos mais velhos foi 38,1% (8/21). No período de diagnóstico P1 (1954-1979), 37,5% dos pacientes foi EBV+ (6/16), em P2 (1980-1999) esses pacientes eram 62,5% (10/16) e em P3 (2000-2008) eram 30,7% (12/39).

A positividade para EBV foi de 81,3% nos linfomas T/NK do tipo nasal (13/16), 40% para o T-angioimunoblástico (4/10) e 24,4% nos linfomas T periféricos SOE (11/45; p= 0.0003).

- **Dados clínicos e EBV**

O perfil clínico dos pacientes com linfomas T/NK e os com positividade para EBV estão sumarizados na **Tabela 44**. Não foi observada diferença significativa para nenhum dos parâmetros em relação aos casos positivos ou negativos para esse vírus.

Tabela 44 - Frequência da expressão de EBV nos pacientes com linfoma T, em relação aos dados clínicos.

DADOS CLÍNICOS	N (%)	EBV+ (%)
TOPOGRAFIA		
Tumor de cabeça e pescoço	36(48,6)	19(52,7)
Tumor torácico e de mediastino	7(9,4)	1(14,2)
Tumor abdominal	5(6,7)	1(20)
Tumor pélvico	3(4,1)	2(66,6)
Outros	20(28,1)	5(25,0)
ESTÁDIO CLÍNICO		
EC I-II	12(16,2)	5(41,6)
EC III-IV	40(54,1)	15(37,5)
SD	22(29,7)	8(36,3)
SINTOMAS B		
Presente	15(20,3)	6(40,0)
Ausente	40(54,1)	16(40,0)
SD	16(22,5)	6(37,5)
IPI		
BR-IR	8(10,8)	3(37,5)
IR-AR	21(28,4)	8(38,1)
SD	42(59,2)	17(40,5)
EVOLUÇÃO CLÍNICA		
OBITOS	39(54,9)	15(38,5)
[MPD]	[39;54,9%]	[15;38,5]
[MPC]	[0;0]	[0;0]
VIVOS	32(45,1)	13(39,4)
[VSD]	[6;8,1%]	[3;50%]
[VCD]	[26;36,6%]	[10;38,4%]
TRATAMENTOS		
Somente QT	28(37,8)	10(35,7)
Somente RT	1(1,4)	0
Com QT+RT	19(25,6)	6(31,6)
SD	23(32,4)	12(52,2)
Esquema CHOP	23(31,1)	10(43,5)
Esquema CHOP-BLEO	2(2,7)	0
Esquema COP/COAP	4(5,4)	1(25,0)
Outros esquemas	18(24,3)	5(27,7)
SD para QT	24(33,8)	12(50,0)
TOTAL	71(100)	28(39,4)

*SD=sem dados;Estádio clínico *Ann Arbor*. **EC I-II** doença menos avançada, **EC III-IV** doença mais avançada (EC III-IV); **IPI**=índice de prognóstico internacional, escalonado em **BR**=baixo risco 0-2 (incluído **IR**=risco intermediário baixo) e **AR**=alto risco >2 (incluído intermediário alto); **VSD**= vivo sem doença; **VCD**=vivo com doença; **MPD**=morto pela doença; **MPC**=morto por outra causa; **COP/CHOP**, esquemas terapêuticos (**Apêndice 2**).

A sobrevida global dos 71 pacientes com linfomas T/NK não mostrou influência da expressão de EBV ($p= 0.65$; **Tabela 45, Figura 30**).

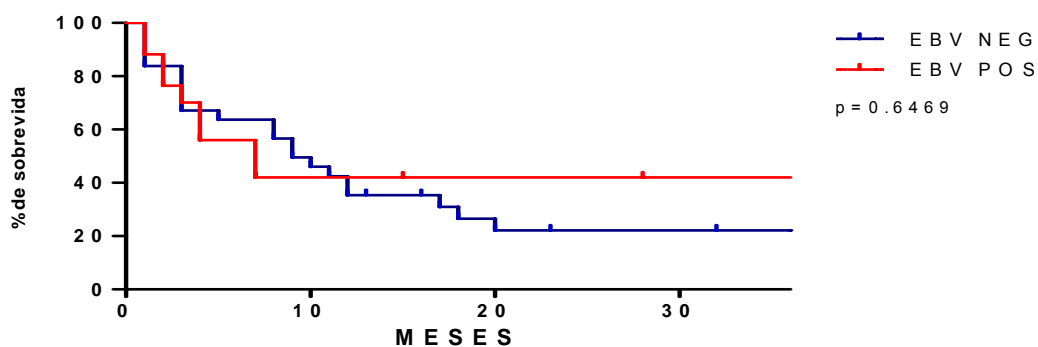


Figura 30 - Sobrevida global de pacientes adultos com linfoma T, com seguimento clínico de 3 anos (n=71).

Tabela 45 - Resumo das taxas de sobrevida dos 71 pacientes com linfoma T, em relação à expressão de EBV.

Taxa de sobrevida relativa (%), em 3 anos	
EBV negativo	n=43 (60,6%)
Óbitos	n=70(55,8%)
Vivos	n=122(44,2%)
EBV positivo	n=28 (39,4%)
Óbitos	n=15 (53,6%)
Vivos	n=13 (46,4%)

4.4 LINFOMAS E HHV8

- **Dados Demográficos e clínicos**

Do total de 2693 linfomas incluídos neste estudo, 101 (4%) foram perdidos, restando 2592 para avaliação do HHV8 por imunistoquímica e hibridização *in situ*. Para os LH houve perda de 9/889 casos (1%) e para os LNH a perda foi de 92/1804 casos (5,1%). Nenhum dos 880 casos de linfoma de Hodgkin estudados revelou expressão de HHV8. Em relação aos LNH, 6/2592 casos (0,2%) foram positivos. Destes, 5 casos foram detectados por imunistoquímica e apenas 2 por HIS. Dentre os 6 casos HHV8+, 3 eram de linfoma difuso de grandes células B (LDGCB, sendo 3/863, ou 0,3%), 2 em linfoma folicular (sendo 2/305, ou 0,7%) e um em linfoma plasmablastico (1 de 4 casos).

Dentre os LDGCB, um dos pacientes tinha 19 anos e dois 38 anos, um era do gênero feminino e dois do masculino, todos procedentes da região sudeste e de etnia branca. Dois dos casos tiveram o diagnóstico no período P2 e um em P3. Um dos pacientes teve diagnóstico em lesão de pele e apresentava disseminação para sistema nervoso central ao estágio. Um dos pacientes teve coexpressão do HHV8 com EBV e SV40 e um outro, coexpressão do HHV8 com EBV. Nenhum dos dois era soropositivo para HIV. Ambos estavam em estágio III-IVB e com IPI de baixo risco. Receberam CHOP + radioterapia, sem indícios de recidivas. Ambos estavam vivos livres de doença, um após um ano e outro após 10 anos do diagnóstico. Uma única paciente não apresentou coexpressão do HHV8 com outros vírus. Apresentava-se gestante ao diagnóstico, tendo recebido

tratamento tardiamente (11 semanas de gestação): foi refratária ao CHOP, novamente tratada com ICE-R + radioterapia, sem resposta, com óbito 19 meses após o diagnóstico.

Os dois pacientes com expressão de HHV8 em linfoma folicular eram do gênero feminino, de 55 e 66 anos, provenientes da região sudeste, de etnia branca e foram diagnosticados no período P2. Ambos estavam vivos no último retorno clínico, um com e o outro sem evidência da doença. Apenas um deles foi estadiado, com doença avançada (EC III) e com informação clínica terapêutica.

O esquema inicial foi CHOP e radioterapia, tendo apresentado duas recidivas ao longo do tratamento, com troca de esquema quimioterápico para ciclofosfamida e fludarabina até a remissão clínica no ano de 2006, finalizando 8,4 anos de seguimento clínico. O outro era soropositivo para HIV, sem informações clínicas logo após a realização do diagnóstico e informação de estar vivo na última consulta.

O paciente com linfoma plasmablastico era do gênero masculino, 35 anos, branco, procedente da região sudeste e diagnosticado em P3 (2002). A topografia do diagnóstico foi em intestino e não havia informações precisas no prontuário quanto à sua evolução ou status do HIV.

4.5 LINFOMAS E SV40

- **Dados Demográficos e clínicos**

Dentre os 2693 linfomas, o estudo para a detecção de SV40 por imunohistoquímica foi formado por 1676 linfomas não Hodgkin e 880 linfomas de Hodgkin, sendo que em 5,1% dos casos (137/2693) houve perda dos tecidos. Houve 19 (0,7%) casos considerados positivos para o SV40: 10 LH e 9 LNH. Ademais, em 200 amostras foi utilizada a hibridização *in situ* para os poliomavírus BKV e JCV, incluindo casos considerados positivos para o SV40, sem reatividade para aqueles.

- **Linfoma de Hodgkin e SV40**

Todos 880 casos de LH foram negativos à pesquisa imunohistoquímica para SV40, enquanto 10/717 (1,4%) foram considerados positivos por HIS. Os casos positivos corresponderam a 9 homens e 1 mulher, idade mediana de 11,1 anos, 8 brancos e 2 não-brancos e todos procedentes da região sudeste. Os períodos de diagnóstico foram 3 em P2 e 7 em P3. Todos os pacientes eram do tipo LH clássico, esclerose nodular. Metade dos casos (5/10) apresentavam coexpressão de EBV.

A topografia predominante foram os linfonodos cervicais (9/10), sendo um caso diagnosticado em linfonodo inguinal. Seis pacientes tiveram estágio I-II, dois III-IV e de outros 2 não havia informação. Sintomas B estavam presentes em 2/8 pacientes. O IPI foi de risco baixo + intermediário baixo em 6/7 pacientes e alto em 1/7. Todos os pacientes estavam vivos no último

retorno clínico, sendo 6/10 sem doença evidente e 4/10 com doença em atividade (mediana de seguimento clínico de 35 meses).

- **Linfoma não Hodgkin e SV40**

Dos 1804 pacientes com linfoma não Hodgkin, 7% (128/1804) não foram estudados pelo método de imunoistoquímica e 14% não foram avaliados por HIS (255/1804), devido a perda tecidual. A detecção do vírus foi de 0,6% em linfomas não Hodgkin (9/1549), todos exclusivamente por HIS e em pacientes com LDGCB (1,1%; 9/847). Destes nove pacientes do LDGCB, 8 eram homens e 1 mulher, 5 da região sudeste, um da nordeste e 3 sem procedência documentada, 5 pacientes entre 19-60 anos e 4 acima dos 60 anos.

O período de diagnóstico foi P2 em 2 casos e P3 em 7/9. A topografia de diagnóstico foi a região de cabeça e pescoço em 7 casos abdominal em 2 e torácica em um. Dos nove casos de LDGCB positivos para SV40 apenas um apresentou coexpressão de EBV, mas nenhum era soropositivo para HIV. O paciente com coexpressão de SV40 e EBV tinha 19 anos, era do sexo masculino, apresentava-se no estágio III-B e com IPI de 1. Foi tratado com CHOP, tendo obtido remissão clínica, sem recidiva ao longo dos 10 anos de seguimento.

Os 8 pacientes com expressão exclusiva de SV40 apresentaram mediana de 60,1 anos, 7 eram homens 4 faleceram em decorrência da doença.

4.6 LINFOMA DE HODGKIN E HIV, CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os relatos clínicos, em LH clássicos 14 pacientes foram soropositivos para HIV em 679 prontuários revistos (2,1%). Destes 7 eram do tipo esclerose nodular, 6 celularidade mista e um depleção linfocitária. Importante esclarecer que o número de casos HIV positivos são subestimados. Este fato é justificado devido a presença de informações clínicas duvidosas combinadas a falta de exames laboratoriais necessários para certificação da positividade ao vírus, nos prontuários estudados. Além disso, a relevância clínica para o estudo viral foi acentuada na década de 90, menor para a década de 80 e ausente em anos anteriores.

A mediana de idade foi 30,3 anos, 10 eram homens e 4 mulheres, a maioria era procedente da região sudeste e de etnia branca. A topografia de diagnóstico predominou na região da cabeça e pescoço (11/14). O período de diagnóstico foi P1 em um caso, P2 em 5 e P3 em 8. Nove pacientes tinham sintomas B. Dez estavam vivos no último retorno clínico (mediana de seguimento clínico=50 meses) dois haviam falecido e dois estavam vivos com doença.

Treze dos 14 pacientes com HIV (93%) apresentavam expressão de EBV na neoplasia, mas não houve expressão de HHV8 ou SV40. O paciente soropositivo para HIV sem expressão neoplásica de EBV foi diagnosticado em 2005 com um nódulo anal, aos 44 anos, com doença avançada e coinfeção pelo vírus da hepatite C. Foi tratado com ABVD e anti-retroviral, estando vivo e sem doença no último retorno clínico (seguimento clínico de 50 meses).

4.7 LINFOMA NÃO HODGKIN E HIV, CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entre os LNH 34 casos eram soropositivos para HIV em 1575 prontuários estudados (2,2%). Os tipos histológicos encontrados foram: LDGCB, com 27 pacientes, linfoma folicular, com 2 casos e um caso cada um, de linfoma T periférico SOE, linfoma primário das cavidades serosas, linfoma da zona marginal nodal, linfoma plasmablástico e linfoma de grandes células anaplásicas CD30+/ALK-. Como descrito para os casos de linfomas de Hodgkin, os casos HIV positivos são subestimados, devido a: infreqüência de exames clínicos laboratoriais comprabotórios a argumentação clínica e a relevância clínica para o estudo viral mais evidente na década de 90.

Dentre os 34 pacientes com LNH e soropositivos para HIV, 14 (41,2%) apresentaram expressão de EBV em 11 LDGCB e um caso de cada tipo de linfoma folicular, linfoma primário das cavidades serosas e linfoma plasmablástico. Dois dos 11 pacientes com LDGCB apresentavam sorologia positiva para vírus da hepatite C (HCV), além da soropositividade para HIV e da expressão de EBV na neoplasia.

A idade mediana foi de 60,1 anos, a maioria do gênero masculino (7/11), brancos (10/11) e da região sul-sudeste (8/11). A coinfeção com o HCV estava presente em um paciente de procedência nordestina e um italiano. Dois paciente foram diagnosticados em P2 e 9 em P3. A topografia tumoral mais frequente foi a cabeça e pescoço. O seguimento clínico foi

curto, com mediana de atendimento de 3 meses, sendo que 9/11 pacientes estavam mortos pela doença.

Dentre os dois casos de linfoma folicular um paciente apresentou coexpressão de EBV, este tinha 34 anos, masculino, branco e da região sudeste do país. O diagnóstico inicial foi realizado no ano de 2005, em estágio avançado (IV), e teve seguimento clínico de 16 meses. Não há maiores informações, mas consta que o paciente estava vivo com doença.

5 DISCUSSÃO

5.1 LINFOMAS DE HODGKIN E EBV

Registros nacionais de câncer (2000-2005) demonstram alta incidência da doença, em crianças e adolescentes, com 9,8 milhões de casos na média populacional, maior em meninos (FERREIRA et al. 2012). A etiopatogenia é avaliada, segundo critérios epidemiológicos, tipo histológico, localização primária do tumor, etnia, sexo e idade (Ministério da Saúde 2009).

Dentre os tipos histológicos mais comuns em linfoma de Hodgkin clássico a Esclerose Nodular (ENOD) e a Celularidade Mista (CM), foi mais incidente em nosso estudo em 70% e 23%, respectivamente. VASSALLO et al. (2005) descrevem frequências semelhantes ENOD (69,2%) e CM (21,1%), de pacientes do sudeste brasileiro, maioria masculinos (60%) atendidos entre 1990-2000. As frequências desses linfomas podem variar quanto a idade, como descrito por BAZZEH et al. (2010), pacientes da Jordânia tiveram incidências próximas aos dados brasileiros para a faixa pediátrica e subtipo CM (22%) e adultos para ENOD (61%).

Nossos dados ainda mostraram que as maiores incidências de ENOD foram maiores para pacientes diagnosticados em períodos mais recentes (73,6%; P3=2000-2008), em relação aos períodos menos recentes (1954-1999, 61-69%). O subtipo CM teve incidência reduzida em P3 (19,8%) em

relação aos períodos passados (24-26%), mas não houve diferença significativa na redução desses linfomas ao longo dos tempos.

Na literatura discute-se que o linfoma de Hodgkin e seus tipos histológicos como ENOD podem estar relacionados ao *status* socioeconômico e de forma indireta, as condições de vida desses pacientes, com elevada incidência em crianças e adolescentes (CORREA e O'CONNOR 1971; HARRIS 1998; JARRETT 2002). A Turquia é um grande exemplo de melhoria do nível socioeconômico com mudança do perfil histológico do linfoma de Hodgkin infantil, sendo percebida a diminuição da prevalência do subtipo CM com aumento de ENOD (ERTEM et al. 1997; BÜYÜKPAMUKÇU et al. 1999; OGUZ et al. 2005).

Segundo a importância da casuística, de interesse clínico e associação a expressão de EBV, esses linfomas são focos de nossa discussão. Resumidamente os resultados e apontamentos da literatura sobre expressão de EBV são apresentados na **Tabela 46**.

Dentre as considerações de variações da expressão de EBV são descritas relações com regiões geográficas, condição socioeconômica, muitas vezes, associadas ao desenvolvimento industrial. Segundo a Agência Internacional do Câncer (IARC 1997) o EBV é considerado agente etiológico (desde 1997) e em linfoma de Hodgkin discute-se fatores demográficos para sua associação, como etnia/raça, gênero e idade, sendo possível relacioná-los a fatores epidemiológicos. Observou-se no total do estudo 56,4% de positividade ao EBV, sendo significativamente mais expressivo em pacientes

com idade infanto-juvenil (73%) e em adultos-maduros (72%), e estes mantendo diferença de expressão de EBV em relação aos adultos-jovens.

A hipótese de endemicidade de EBV em linfomas de Burkitt é bem estabelecida em regiões da África Equatorial, e esporádica em países Ocidentais, e em nosso meio, há sugestão de frequência intermediária no nordeste do país. Essa hipótese, para linfoma de Hodgkin clássico, na idade pediátrica é sugerida para a mesma região do país (ARAUJO et al. 1996; 2006) e, se deve a alta frequência de EBV (86,7%), mais positivos em jovens ($p=0.051$) e nos tipos histológicos CM (100%) e ENOD (83%), DL (100%), e ELGUI de OLIVEIRA et al. (2002) sugerem associação à condição socioeconômica, e outros estudos enfatizam a relação aos tipos e idade dos pacientes (GLASER et al. 1997; ENGEL et al. 2000).

Em nosso estudo o subtipo histológico CM demonstrou ter prevalência viral pediátrica (92%), sendo que nesta faixa de idade, no total do estudo tivemos 73% de positividade ao EBV. GLASER et al. (1997) também se referem a forte associação de EBV ao subtipo histológico, idade e pior condição socioeconômica (>80%), sendo corroborado por ELGUI de OLIVEIRA et al. (2002).

FLAVELL et al. (2000) sugerem que incidências populacionais para linfoma de Hodgkin no Reino Unido seriam reflexos da presença de comunidades mais pobres, e comparativamente, em nosso meio, o sudeste possui “bolsões” de comunidades de baixo nível socioeconômico em regiões de grande desenvolvimento industrial/econômico. Portanto,

fatores adicionais nos estudos de prevalência viral e sua associação as realidades regionais, devem ser melhor esclarecidas.

Em regiões do país com maior desenvolvimento industrial (sudeste) as frequências também foram altas para a faixa pediátrica/CM 83%, 87% mencionadas por ARMSTRONG et al. (1993) e CHABAY et al. (2008). BARROS et al. (2010) descrevem frequências menores de CM (23%), e 52%, 59%, respectivamente, para pacientes da Argentina e do Sul do país descritos por RAZZOUK et al. (1997) e CHABAY et al. (2008). Não tivemos diferença significativa na distribuição de EBV entre regiões do país e tipos histológicos.

A prevalência do vírus atinge 100% dos casos de CM em pacientes pediátricos, no nordeste do país (ABREU et al. 1997; ELGUI DE OLIVEIRA et al. 2002; ARAUJO et al. 2006). Essa frequência é alta também na Arábia Saudita, Peru e África do Sul, com variações da expressão, embora altas, em países mais desenvolvidos (ARMSTRONG et al. 1993; CHANG et al. 1993; ANDRIKO et al. 1997; RAZZOUK et al. 1997; ENGEL et al. 2000; KEEGAN et al. 2005; CLAVIEZ et al. 2005).

Nos adultos as frequências de CM foram altas em nossos achados, adulto-jovens (78%) e maduros (81%). No Brasil, a expressão de EBV variou entre 88-100% nos mais jovens em regiões sudeste e nordeste do país, na América do Norte e Europa entre 50-86% (MOHAMMED et al. 1995; NARESH et al. 2000; VASSALLO et al. 2001; KEEGAN et al. 2005; SOUZA et al. 2010). Na China e no Peru as frequências foram alta, semelhantes aos nossos dados, 74% e 100%.

Nos adultos (>45 anos), na Costa Rica, México e Peru as frequências foram mais altas para a expressão de EBV no subtipo CM (75-100%), semelhante aos nossos dados. Em estudos europeus e norte-americanos as frequências foram menores 50-69% (HERBEST et al. 1991; GULLEY et al. 1994; KEEGAN et al. 2005; DIEPSTRA et al. 2009).

Em nosso estudo, observamos que além da expressão de EBV em CM na idade pediátrica, nos períodos de diagnósticos menos recentes, há maior prevalência viral em P1 (1954-1979; 93,3%) e P2 (1980-1999; 92%). Nas idades infanto-juvenis e adulta-madura as frequências de EBV foram altas (91,5% Vs 80,7%), e em adultos-jovens 77,9%, sem diferença entre eles. E, essas frequências foram mantidas elevadas em cada grupo etário e distintos períodos de diagnóstico, sem redução significativa ao longo dos tempos.

No entanto, observou-se redução da expressão de EBV no subtipo ENOD ($p < 0.02$), de forma progressiva em relação aos tempos menos recentes (P1=92,3%), e mais recentes (P2= 60%; P3=48,3%), com valor significativo para a análise. Houve redução de EBV em pacientes infanto-juvenis e adulto-jovens ao longo dos tempos, sendo maior a expressão de EBV em pacientes adultos (>45 anos), e em período mais recente (P3=2000-2008; 69,3%), e nos mais jovens (AD-J 26,8%; INF=48,3%)

Na avaliação da expressão de EBV, em cada período de diagnóstico, houve diferença de casos positivos, sendo mais prevalentes nos extremos etários. Em P2 (INF=60%; AD-M 69,2%), P3 (INF=48,3%; AD-M=69,3%), e não houve diferença em período menos recente (P1). No total do estudo,

pacientes com ENOD e EBV positivos, reflete a maior associação viral para pacientes dos extremos etários (INF=61%; AD-M 70%), e menor em adultos-jovens (37%).

Na literatura, esse linfoma mostra frequência de EBV em cerca de 25% dos casos (GLASER et al. 1997). Quando comparado aos países mais desenvolvidos do grupo pediátrico, as frequências variam entre 22-38% (ARMSTRONG et al. 1993; RAZZOUK et al. 1997; ANDRIKO et al. 1997; CLAVIEZ et al. 2005; KEEGAN et al. 2005). No Peru, Brasil, Argentina e África do Sul, as frequências variaram entre 50-100% (ARMSTRONG et al. 1993; CHANG et al. 1993; ABREU et al. 1997; RAZZOUK et al. 1997; ENGEL et al. 2000; ARAUJO et al. 2006; BARROS et al. 2010).

Nos adultos para esse linfoma as frequências foram altas em nossos achados, em adultos maduros (70%), e menor em mais jovens (37%). Na literatura, pacientes adultos mais jovens tiveram frequências mais baixas em regiões da China e Estados Unidos (14 e 15%) (KEEGAN et al. 2005; HUANG et al. 2011). Nos estudos formados na França, Nordeste do Brasil, e Sudeste as frequências foram iguais ou semelhantes aos nossos resultados (MOHAMMED et al. 1995; ELGUI DE OLIVEIRA et al. 2002; SOUZA et al. 2010). Observou-se variações entre 50-67% em estudos do sudeste do Brasil, Estados Unidos, Peru (CHANG et al. 1993; NARESH et al. 2000; VASSALLO et al. 2001).

Em pacientes adultos-maduros com ENOD e positividade ao EBV as maiores frequências foram descritas para pacientes do Peru (50%) e México (100%), e menores com variações entre 20-27% na Costa Rica e Estados

Unidos e entre 33% e 37% na Holanda e Alemanha (HERBST et al. 1991; CHANG et al. 1993; GULLEY et al. 1994; KEEGAN et al. 2005; DIEPSTRA et al. 2009). Nossas frequências variaram entre 69-72% nos três intervalos de diagnósticos (P1-P3), não tendo redução de suas frequências ao longo dos tempos. Nossas frequências são intermediárias as descritas por CHANG et al. (1993) e GULLEY et al. (1994), de pacientes provenientes de outras regiões da América do Sul.

Para estabelecer associação causal etiológica é sugerida a presença persistente do genoma viral (latente) em células malignas com surgimento da doença posterior a infecção, como para linfoma de Burkitt (GHOSH et al. 2012). E, sua expressão persistente em células B é presente em fenótipo maligno, com atividade proliferativa não coordenada (CRAWFORD 2001). Portanto, estudos epidemiológicos devem contribuir para melhor entendimento da causalidade etiológica da doença.

Em nosso meio estudos prospectivos epidemiológicos são descritos por MONTEIRO et al. (1998) que mencionam alta prevalência de EBV no Pará (Norte do Brasil), com variação de soropositividade ambulatorial (53-95%) e nas comunidades economicamente menos favorecidas (81-100%). Na região sudeste (Rio de Janeiro), pacientes com linfoma de Hodgkin apresentam alta prevalência viral (91%) detectado em plasma, por PCR (MUSACCHIO et al. 2006). Observa-se menor frequência (55%) em estudo retrospectivo de pacientes de mesma origem regional (LOUREIRO et al. 2004).

Estudos nacionais epidemiológicos prospectivos (2001-2005) são descritos para avaliar o impacto do *status* socioeconômico (SES) em pacientes com linfoma de Hodgkin, independente do agente etiológico. Neste caso, observou-se diferença entre grupos de SES superior (78%) e inferior (22%) em relação a taxa de remissão completa (85% SES superior Vs 72% inferior), com tendência ao pior desempenho clínico e óbito durante o tratamento para os do grupo SES inferior (SOARES et al. 2006).

A associação de EBV em linfomas de Hodgkin quanto a etnia/raças é controversa e com poucas citações na literatura, como exemplos temos estudos descritos por GLASER et al. (1997) e ENGEL et al. (2000). Não observamos associação em nosso estudo. Vale considerar que em nosso país há polimorfismos de DNA em estudos que promovem alinhar ancestralidades comuns Européia, Africana e Ameríndia (PENA et al. 2011). DA SILVA MC (2011) sugerem forte associação á ancestralidade européia (57,7%), e com frequências menores a africana (33,8%) e de Ameríndios (3,5%), com presença de miscigenação individual (11,5% africana) e intermediária 15-85%, dificultando relações entre doenças comuns aos fatores étnicos.

5.1.1 Dados clínicos e sobrevida de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico e status de EBV

Sem dúvida fatores clínicos bem estabelecidos (idade, histologia, estágio clínico, sintomas B, IPS, ano de diagnóstico), favorecem distinguir evolução e a resposta terapêutica de pacientes com linfomas de Hodgkin. O

tratamento dos pacientes foi definido por protocolos nos cinco serviços hospitalares, colaboradores com a pesquisa, vigentes à época do diagnóstico.

Em linhas gerais, a poliquimioterapia associada ou não a radioterapia dependeu da idade, estadiamento da doença e evolução clínica em diferentes períodos de admissão e diagnóstico do linfoma (1954-2008). O esquema ABVD é o padrão “ouro” de tratamento, e menos comum, mas com resposta terapêutica semelhante, MOPP-ABV ou MOPP-ABVD (CONNORS et al. 1997, DUGGAN et al. 2003; CARBONE et al. 2011).

Em nossos resultados, em geral, os pacientes tiveram bom prognóstico com IPS 0-2 (62,5%), e proporção semelhante quanto ao estágio clínico *Ann Arbor* (I-II 43,9% Vs. III-IV 53,1%). Os pacientes EBV positivos apresentaram características clínicas significativamente diferentes para aqueles com IPS ≥ 3 (67,7%; $p=0.04$) estágio clínico III-IV 59,3% ($p=0.0026$).

Independente dos critérios clínicos e faixas de idades, em nossos resultados, pode-se observar sobrevida desfavorável nos casos positivos ao EBV ($p=0.0015$) e nas idades infanto-juvenis ($p= 0.0206$), adultos-jovens ($p <0.0001$), mas não relacionados a sobrevida doença-específica, para os esquemas terapêuticos ABVD, MOPP-ABV ou MOPP-ABVD.

HSU et al. (2007) mencionam que brasileiros nordestinos tiveram diferença na taxa de sobrevida global e livre de eventos, em relação a pacientes norte-americanos possivelmente por diferenças da prática terapêutica. E, estudo de grande escala sueco ($n=6949$) relaciona a

favorável sobrevida dos pacientes atendidos entre 1973-2009 ao avanço terapêutico ($p < 0.0005$), (SJÖBERG et al. 2012). Os ajustes de doses radioterápicas e combinações com esquemas quimioterápicos tendem a minimizar seus efeitos nos tratamentos atuais (YAHALOM 2009). Os pacientes mais jovens respondem bem ao ABVD (89,5%), com remissão completa, e a radioterapia mais associada ao uso de MOPP (SOUZA et al. 2009). A sobrevida das crianças com linfoma de Hodgkin tem aumentado com a introdução da poliquimioterapia antineoplásica e da radioterapia com campos envolvidos em baixas doses (OGUZ et al. 2005).

5.1.2 Dados clínicos e de sobrevida, em relação a expressão de EBV dependente da idade dos pacientes

Os pacientes pediátricos tendem a apresentar sintomas B, com baixa frequência (FARIA et al. 1996; OGUZ et al. 2005). O estágio clínico I-II e III-IV têm sido descrito em cerca de 50% nos casos pediátricos, sendo maior (cerca de 70%) em adultos, com doença mais avançada, descritos por estudos nacionais (FARIA et al. 1996; LOUREIRO et al. 2004). O estágio clínico I-II e III-IV foi semelhante na população mais jovem, infanto-juvenil e adulto-jovem (31-36% Vs 42,6-42,3%). A presença de sintomas B foi maior em adultos-jovens.

Ao estudar esses dados e EBV observou-se que pacientes infanto-juvenis apresentaram maior expressão de EBV nos estádios clínicos (I-II 73,6% e III-IV 70,8%), em relação aos adultos-jovens (I-II 34,3% e III-IV 48,3%). Há diferença significativa de EBV entre os grupos etários e estágio

clínico I-II ($p < 0.0001$), sem valor para outras análises entre os grupos. Pacientes com presença de sintomas B e expressão de EBV foi diferente entre as idades, e mais acentuada em infanto-juvenis e adulto-maduros do que o outro grupo.

KEEGAN et al. (2005), CLAVIEZ et al. (2005) não relacionam os critérios clínicos com impacto negativo aos pacientes pediátricos EBV positivos, concordante ao descrito por VASSALLO et al. (2001) em pacientes com idade adulta, e mais jovem. O impacto de EBV é observado em nossos resultados em pacientes com doença mais avançada em relação à desfavorável sobrevida nos casos positivos ao vírus, em idade infanto juvenil ($p = 0.05$) e adulta, mais jovem ($p = 0.003$).

Quanto ao índice de prognóstico os pacientes mais jovens foram avaliados clinicamente como de baixo e intermediário baixo risco (61-66%), e na expressão de EBV os infanto-juvenis em relação aos adultos jovens, tiveram maior prevalência viral (64,4% Vs. 34,6%; $p < 0.0001$). Houve mais expressão de EBV em pacientes com IPS > 2 , em ambos os grupos etários, sem possibilidade de avaliação estatística, devido a casuística.

Nossos achados diferem dos da literatura quanto à frequência viral em pacientes estratificados quanto ao estágio clínico *Ann Arbor* e sintomas B, neste caso, a expressão viral foi mais elevada em pacientes infanto-juvenis e com melhor prognóstico IPS 0-2.

Em comparação aos dados descritos por CLAVIEZ et al. (2005) pacientes pediátricos europeus apresentaram diferença da expressão de EBV entre os tipos histológicos, mais prevalentes em CM (69% Vs. 91,5%)

em relação ao ENOD (22% Vs. 60,6), e mais relacionado às idades mais jovens (<5 anos).

A frequência de EBV no subtipo histológico ENOD (27%) foi também baixa para pacientes pediátricos norte-americanos comparados ao estudo alemão, e diferem dos nossos resultados ao total de expressão de EBV em linfomas de Hodgkin (31%, 44% Vs 71,1%) para diagnósticos realizados entre 1980-1999 (KEEGAN et al. 2005; CLAVIEZ et al. 2005). No estudo europeu, houve resultados semelhantes aos nossos dados sobre o impacto de EBV em pacientes pediátricos e sobrevida.

CLAVIEZ et al. (2005) relacionam os pacientes pediátricos EBV positivos a sobrevida global ($p= 0.017$), e em subtipo histológico ENOD ($p= 0.003$), e nesse caso à sobrevida livre de falhas ($p= 0.02$). Em nosso estudo pacientes da idade infanto-juvenil e adulta-jovem com linfoma Esclerose Nodular foi correlacionada à sobrevida desfavorável, nos casos EBV positivos (INF $p=0.0242$; AD-J $p <0.0001$), independente dos esquemas terapêuticos e mantendo resultados semelhantes para pacientes que utilizaram esquemas terapêuticos comuns e que refletem boa resposta terapêutica (INF $p= 0.0010$; AD-J $p <0.0304$), e tiveram como característica maior taxa relativa de óbitos.

O oposto dos resultados apresentados foram descritos por KEEGAN et al. (2005) que relacionaram a expressão de EBV aos pacientes pediátricos com favorável sobrevida global doença-específica ($p=0.07$). ENGEL et al. (2000) corroboram com o estudo pela ausência do impacto de

viral na sobrevida de pacientes pediátricos africanos, embora com maior expressão de EBV(67%), mais próxima ao nosso dado (P2=71,1%).

Pacientes adultos jovens e masculinos com características clínicas e terapêuticas semelhantes ao nosso estudo não se correlacionaram ao status de EBV e sobrevida (global e livre de eventos), descrito por SOUZA et al. (2010). KEEGAN et al. (2005) corroboram com esse estudo, em relação a idade e não associa outros fatores nos casos positivos (ENOD, CM, gênero). Os pacientes norte-americanos e brasileiros, para a idade adulto-jovem apresentaram frequências semelhantes de EBV (59% Vs. 52% Vs. 45%), diferindo no subtipo histológico ENOD (14% Vs. 37% Vs. 37%).

Como informação adicional às informações clínicas pacientes com Esclerose nodular, não apresentaram diferença de expressão de EBV quanto ao grau histológico e entre os grupos etários, corroborando com estudo brasileiro pediátrico (BARROS et al. 2010).

A análise de sobrevida foi semelhante entre estudos pediátricos europeus e os nossos, diferindo aos dos norte-americanos, e parece ser independente do tipo de análise estatística (Global, Doença específica ou livre de falhas), ou para a expressão de EBV, e compatibilidade ao período de diagnóstico.

A casuística para o número de casos infanto-juvenis e positivos ao EBV diferem dos de CLAVIEZ et al. (2005), aos nossos resultados, e esses aos de KEEGAN et al. (2005), respectivamente, no total do estudo 263/842; 124/169; 16/36 e para o subtipo ENOD 122/549, 60/99; 6/22. Nossos dados corroboram com o estudo alemão, como por sua maior casuística.

O estudo de pacientes adultos jovens foram incompatíveis aos dados descritos por KEEGAN et al. (2005), e ao brasileiro por SOUZA et al. (2010), e comparado ao número de pacientes e casos positivos, em cada estudo ao nosso resultados é possível constatar, respectivamente, 119/617; 51/97 e 224/499, e para o subtipo ENOD 72/498, 25/68 e 145/390. Nesse caso, nossa casuística foi maior para o número de pacientes do grupo etário e positividade viral, em relação aos dados americanos e brasileiros.

Em estudos de sobrevida livre de doença e global 90,77% e 96,22% dos casos estudados de pacientes pediátricos foram relacionados mais aos fatores de doença extranodal, nível de hemoglobina (<11g/d), números de linfonodos envolvidos e estágio clínico IV (OGUZ et al. 2005).

Para o estudo de comportamento biológico tumoral é indicada a realização de análise de sobrevida livre de doença ou livre de falha (FFS, sigla do inglês *failure-free survival*). Embora haja discrepâncias para esse argumento, como observado nos resultados descritos por OGUZ et al. (2005). Outras propostas são para avaliar prognóstico e evolução clínica após terapias de primeira linha ou de resgate (após recaída), excluindo-se fatores como mortes por outra causa.

Para minimizar “erros de leitura” estudamos pacientes que usaram terapia ao diagnóstico com esquemas poliquimioterápicos bem conhecidos e com respostas semelhantes, mortos pela doença. Esse estudo foi comum a literatura concordante ao nosso (pediátrico), promovendo estudos restritos a idade e tipo histológico. No entanto, teremos como proposta futura de

elucidar melhor os dados obtidos validando-os com o teste de sobrevida livre de doença ou de falhas.

Pacientes com diagnóstico de esclerose nodular foram menos positivos ao EBV em relação ao subtipo Celularidade mista, com maior frequência nos extremos etários, clinicamente distintos, principalmente a maior presença de pacientes com estágio clínico mais avançado, óbitos pela doença para os casos adultos >45 anos, e este grupo denota interesse clínico para a melhora da taxa de sobrevida em relação a evolução terapêutica.

Esses pacientes parecem não diferir quanto as características clínicas e grau histológico do linfoma Esclerose Nodular, entre adultos mais jovens e mais velhos, entre eles, sintomas B, com variação semelhante entre IPS de baixo e alto risco (40-60% Vs 44-55%), respectivamente ao grau histológico I e II, e fato semelhante para estágio clínico I-II Vs III-IV, sem diferença entre os gêneros (PRACCHIA et al. 2005). Além disso, esses pacientes apresentaram taxa de sobrevida global e livre de doença (>90 meses), sem diferença na probabilidade relativa de sobrevida. Outros estudos discutem importância de parâmetro morfológico e laboratorial impactante na intervenção terapêutica para doença de intermediário e alto risco (VON WASIELEWSKI et al. 2003). São controversas as discussões de impacto de prognóstico e grau histológico (BENNETT et al. 1981; VON WASIELEWSKI et al. 2003).

Essas discussões podem promover interesses sobre a avaliação do impacto de EBV em pacientes adultos (>45 anos) com linfoma de Hodgkin, e

para o subtipo ENOD. KEEGAN et al. (2005) relacionada à sobrevida desses pacientes com impacto de EBV ($p= 0.01$) com frequência viral inferior aos nossos dados (27%; 35/129 Vs. 70%; 74/106) e no total de EBV no grupo etário (42%; 113/269 Vs. 72%131/182). DIEPSTRA et al. (2009) corroboram com os dados de KEEGAN et al. (2005), para pacientes adultos maduros (>50 anos; $p= 0.010$) com expressão ao EBV semelhante no total do estudo e para o subtipo ENOD. Provavelmente, a diferença se deve ao número de óbitos EBV positivos nessas análises, sendo visto que em nossos resultados a maioria é negativa ao vírus. Nosso estudo sugere fator protetor da presença de EBV nos pacientes com idade superior a 45 anos, diferindo aos dados descritos por Keegan et al. (2005) e Diepstra et al. (2009). Outros estudos devem ser realizados para melhor compreender esses resultados, como por análises multivariadas, para associação de expressão de EBV e sobrevida desses pacientes.

Tabela 46 – Frequência de expressão de EBV nos tipos de linfomas de Hodgkin clássicos e em relação à idade: análise da literatura.

Literatura	País	EBV n(%)	Idade	CM n(%)	ENOD n(%)
Nossos resultados	Brasil	479/850(56)	Todas	160/193(83)	279/595(47)
	S-SE	331/610(54)			
	N-NE-CO	83/141(59)			
	INF	124(73)	INF	54/59(92)	60/99(61)
	ADJ	224(45)	AD-J	60/77(78)	145/390(37)
	ADM	131(72)	AD-M	46/57(81)	74/106(70)
Andriko et al. 1997	EUA (1984-1996)	17/44(39)	INF	3/4(75)	5/13(38)
Razzouk et al. 1997	EUA (Déc.90?)	15/26(58)	INF	12/17(71)	2/6(33)
Keegan et al. 2005	EUA (1988-1997)	16/36(44)	INF	6/6(100)	6/22(27)
Keegan et al. 2005	EUA (1988-1997)	119/617(19)	AD-J	39/66(59)	72/498(14)
Keegan et al. 2005	EUA (1988-1997)	113/269(42)	AD-M	53/81(65)	35/129(27)
Gulley et al. 1994	EUA (Déc 90?)	27/74(36)	AD	21(67)	53(25)
Naresh et al. 2000	EUA (1984-1988)	86/110(78)	AD-J	52(86)	41(67)
Diepstra et al. 2009	Holanda 1989-2000	98(45)	AD-M	13(69)	73(37)
Claviez et al. 2005	Alemanha (1990-2001)	263/842(31)	INF	131/190(69)	122/549(22)
Herbest et al. 1991	Alemanha (Déc 90?)	18/47(38)	AD	9/18(50)	9/27(33)
Armstrong et al. 1993	Reino Unido (1976-1989)	21/59(36)	?AD?	?/28	?/27
Armstrong et al. 1993	Reino Unido (Déc 90?)	13/22(59)	INF	7/7(100)	4/12(33)
Mohammed et al. 1995	França (1990-1992)	7/21(33)	AD-J	2/4(50)	5/16(31)
Chang et al. 1993	Peru (Déc 90?)	20/20(100)	INF	15/15(100)	4/4(100)
Chang et al. 1993	Peru (Déc. 90?)	5/9(55)	AD-J	3/3(100)	1/2(50)
Chang et al. 1993	Peru (Déc. 90?)	3/3(100)	AD-M	2/2(100)	1/1(100)
Razzouk et al., 1997	Brasil/Sul (Déc.90?)	15/26(58)	INF	10/17(59)	3/6(50)
Araujo et al. 2006	Brasil/NE (1976-1996)	78/90(87)	INF	50/50(100)	25/30(83)

Cont/ Tabela 46

Literatura	País	EBV n(%)	Idade	CM n(%)	ENOD n(%)
Armstrong et al. 1993	Brasil/SE (Dec.90?)	18/25(72)	INF	10/12(83)	7/10(70)
Abreu et al. 1997	Brasil/NE (1985-1995)	28/34(82)	INF	22/22(100)	5/10(50)
Barros et al. 2010	Brasil/SE (1999-2006)	43/96(45)	INF	22/96(23)	67/96(69)
Chabay et al. 2008	Brasil/SE (1998-2003)	31/65(48)	INF	7/8(87)	54/65(83)
Elgui de Oliveira et al. 2002	Brasil/NE (Déc.90?)	28/34(82)	INF	22/22(100)	4/10(40)
Elgui de Oliveira et al. 2002	Brasil/SE (Déc.90?)	18/31(58)	INF	16/21(76)	1/5(20)
Elgui de Oliveira et al. 2002	Brasil/NE (Déc.90?)	5/16(60)	AD-J	2/6(33)	3/8(38)
Vassallo et al. 2001	Brasil/SE (1987-1998)	10/15(66)	AD-J	7/7(100)	0/4(0)
Souza et al. 2010	Brasil/SE (1994-2004)	50/78(64)	AD-J	14/15(93)	36/61(59)
Chabay et al. 2008	Argentina (1990-2005)	51/97(52)	AD-J	24/27(88)	25/68(37)
Gulley et al. 1994	México (Déc 90?)	60/111(54)	INF	58/111(52)	43/58(74)
Gulley et al. 1994	Costa Rica (Déc 90?)	24/31(77)	AD	23(87)	8(50)
Glaser et al. 1997	Várias regiões (<1995)	5/14(36)	AD	4(75)	10(20)
Huang et al. 2011	China/Norte (1987-2000)	618(40)	INF/ AD	(75)>risco Asia/China;	(25)>INF e AD-M
Armstrong et al. 1993	Arábia Saudita (Déc 90?)	62/157(39)	AD-J	34/46(74)	12/78(15)
Engel et al. 2000	África do Sul(1983-1995)	7/8(88)	INF	5/5(100)	2/2(100)
Mohammed et al. 1995	Algéria (1990-1992)	32/47(68)	INF	4/5(80)	28/42(67)
		18/25(72)	AD-J	8/9(88)	10/16(63)

(*)foi realizado arredondamento das frequências da literatura para facilitar estudo comparativo; Brasil, regiões: **SE**=Sudeste; **NE**=Nordeste; detecção viral pelo método de imunistoquímica e/ou hibridização *in situ*.

5.2 LINFOMAS NÃO HODGKIN E EBV

No total dos casos de linfomas B periféricos, a maior frequência de EBV foi observada em linfoma de Burkitt (58,3%), e houve associação do vírus para os de idade infantil e mais frequente em meninos (76,2%). Esses dados são corroborados por outros estudos nacionais, com semelhante frequência do vírus em pacientes procedentes da região SE (45-50%), meninos descrito por Queiroga et al. (2008, 2009) e 61% por Hassan et al. (2008), sendo frequente o EBV tipo I (85-86%), comum em LB esporádico (Queiroga et al. 2009; Klumb et al. 2004; Hassan et al. 2008). As frequências de EBV em nosso meio sugerem endemicidade intermediária as descritas no EUA (15-30%) e África Central (95%), (Shiramizu et al. 1991, Bornkamm, 2009). As regiões do país com pior condição socioeconômica apresentam frequências de EBV mais elevadas (N=76% e NE=63-87%), em estudo retrospectivo, com uso de sonda EBER/ISH (Queiroga et al. 2008, 2009; Araújo et al. 1996; Klumb et al. 2004).

O perfil clínico é de tumor extranodal (abdominal, crianças) procedentes da região sudeste do país (64,6-72%), (Queiroga et al. 2008; Hassan et al. 2008). Em região socioeconômica menos favorecida (NE-Brasil) é semelhante o predomínio de tumor primário extranodal (Pedrosa et al. 2007), sendo comum em ambas as regiões, pacientes pediátricos com doença avançada, com frequência semelhante aos nossos achados. A presença de EBV em pacientes com doença avançada é alta para a região sudeste (75-77%), descrita por Klumb et al. (2004) e Hassan et al. (2008),

corroborando com nossos dados (68,7%), não havendo associação ao EBV entre os critérios clínicos avaliados (estádio clínico, sintomas B). Em geral, o prognóstico é favorável com sobrevida global e livre de doença em cerca de 70% dos casos (Pedrosa et al. 2007) e nos casos positivos ao EBV, em nosso estudo, 62,1% dos pacientes estavam vivos e 73% deles, sem doença no último retorno clínico (seguimento de 15 anos). A relação de pacientes vivos e óbitos parecem indicar boa resposta terapêutica pediátrica, e não houve associação ao status de EBV e sobrevida, no estudo.

Pacientes com linfomas LDGCB foram positivos em 8,8% dos casos, com frequência idêntica para o gênero masculino e feminino com 8,9%, e em não brancos a expressão de EBV foi um pouco maior 9,7%, sem diferença estatística.

Nossos dados corroboram OYAMA et al. (2007) que descrevem 9% de expressão de EBV em pacientes adultos do leste da Ásia, e por HOFSCHEIER et al. (2011) que detectaram a expressão viral em 7% de pacientes mexicanos (>50 anos) com linfoma LDGCB, e apenas 2% para os de origem alemã. Esses dados demonstram que a frequência viral de origem européia é menor, corroborando com esses achados em estudo realizado por HOELLER et al. (2010), que detectaram positividade em 3,1% de adultos maduros com a doença. Outros sugerem que a diferença de distribuição de EBV pode depender de critérios de estudos, sugerindo classificação de células tumorais por análise de hibridização *in situ* (sonda/EBER), (WADA et al. 2011).

UNER et al. (2011) descrevem que pacientes originados da Turquia, adultos maduros, com diagnóstico para a doença entre o ano 1999-2009 foram positivos ao EBV em 5,3% dos casos (18/340), com relação a desfavorável sobrevida ($p < 0.0001$). Nossos dados mostram maior frequência de EBV para adultos jovens (15,1-60 anos; 10,2%) e para os de > que 60 anos (6,8%), com doença avançada e sintomas B. Além disso, a sobrevida foi mais favorável aos casos negativos de EBV, sem valor significativo em adultos. Esse fato foi corroborado com a presença de semelhante taxa de sobrevida relativa entre pacientes vivos e óbitos e com pacientes clinicamente com melhor prognóstico EBV positivos.

A sobrevida de pacientes LDGCB pode ser influenciada pela escolha do esquema terapêutico. VAN OERS et al. (2005) descrevem sobre diferença na SLD de pacientes com linfomas que receberam esquemas CHOP ou CHOP-R. A manutenção terapêutica com rituximab é comum para doenças refratárias (RUMMEL 2010).

OYAMA et al. (2007) compararam a evolução de pacientes EBV+/LDGCB aos casos negativos que utilizaram o esquema CHOP, sendo observado pior resposta a terapia, em pacientes positivos ao EBV, com remissão da doença de 63% e nos negativos (91%). Em nosso estudo a análise de sobrevida específica de pacientes adultos que usaram esquema CHOP, CHOP-R e CHOP-BLEO, e sobrevida global independente do esquema terapêutico, não houve associação ao EBV. Os pacientes negativos ao vírus tiveram remissão completa em 88% dos casos (155/177) e nos positivos 49% (22/45).

A combinação terapêutica CHOP-R é indicada para tratamento de adultos com doença avançada, mas pode estar relacionada ao efeito positivo de sobrevida nos casos EBV positivos, segundo revisional da literatura descrito por CASTILLO et al. (2011). Tivemos menor número de pacientes que usaram o tratamento CHOP-R EBV positivos, sendo comum para aqueles que usaram isoladamente o esquema CHOP.

O uso de Rituximab combinado ao CHOP ou em terapia de manutenção foi internacionalmente proposto pela FDA, USA em 2007 como anticorpo monoclonal para uso de linfomas B com impacto positivo na terapêutica de doença refratária (BELLO e SOTOMAYOR 2007). Desta forma o entedimento da biologia do tumor e parâmetros clínicos para idade se torna alvo para estudos do avanço terapêutico (SANDLUND 2007).

Os casos infanto-juvenis com linfoma LDGCB foram infrequentes e com alta expressão de EBV (33,3%), eram meninos e com doença avançada. AKTAS et al. (2009) tiveram resultado semelhante com 25% dos casos positivos, e linfomas B EBV+ pediátricos e imunossuprimidos podem estar associados a SLD, sugestivo de papel em linfomagênese (CHABAY et al. 2011).

O estudo de pacientes com linfoma Folicular mostrou frequência semelhante para os casos positivos ao EBV (8,6%) em relação aos LDGCB. No entanto, para nossa surpresa, tivemos maior expressão viral em pacientes adultos >60 anos (10,7%) e menor nos mais jovens 7,7%, com diferença estatística limítrofe entre os gêneros (homens 12,7%;e mulheres 6,2%).

Além disso, obtivemos diferença na análise da sobrevida em relação ao status de EBV (p limítrofe 0.08), merecendo atenção em estudos futuros, ampliando a casuística e delimitando fatores demográficos e clínicos. A taxa de sobrevida foi maior para pacientes EBV negativos, e maior frequência de óbitos em casos positivos Vs. negativos ao vírus (53,8% Vs. 32,9%); menor para vivos (46,2% Vs 67%). Dado ainda relevante e não descrito na literatura, é que houve impacto na sobrevida de doença específica para os pacientes que usaram somente CHOP EBV positivos ($p=0.003$), com maior taxa de sobrevida relativa aos negativos (88,2%) e menor frequência de óbitos (41,6%) em relação aos positivos ao vírus (87,5%).

Os esquemas terapêuticos descritos para linfoma DGCB também são propostos para linfoma B indolente (Folicular), e para pacientes com índices de prognósticos menos favoráveis da doença (FLIPI) é recomendado o uso de esquema CHOP e uso de Fludarabina-Rituximab na manutenção terapêutica, descrito por grupo de estudo para linfomas indolentes alemão ou GLSG, (FORSTPOINTER et al. 2006), sendo mais favorável a resposta terapêutica em adultos mais jovens com boa tolerância, para as formas mais agressivas da doença (SALLES 2007).

Os pacientes EBV positivos para a doença, em nossos resultados, tiveram maior expressão do vírus para aqueles que usaram CHOP (11,8%), e menor para outros esquemas, como CHOP-R (5,5%), e com maior risco clínico para a doença (IPI IR-AR 13,8%, EC III-IV 9,4%), sendo usado em sua maioria o esquema exclusivo CHOP.

A associação de EBV em linfomas indolentes são infrequentes, e menor especificidade ao folicular. KOREISHI et al. (2011) descrevem caso isolado de linfoma folicular (grau 3A), com EBER positivo focalmente, e raras células HHV8 coinfectadas (HIV negativo). A localização preferencial de EBV é sugerida para regiões extrafoliculares ou interfoliculares e não em centros germinativos (GC), e a região topográfica preferencial ao vírus pode favorecer menor presença de EBV em linfomas foliculares ou PLN em linfoma de Hodgkin (TAN 2009).

5.3 LINFOMAS DE HODGKIN E NÃO HODGKIN B, HIV/EBV

As frequências no total de pacientes soropositivos de cada linfoma com coinfeção ao EBV foram semelhantes, em não Hodgkin (2,2%) e Hodgkin (2,1%).

Em linfomas não Hodgkin a positividade de EBV em HIV positivos foi maior para linfomas de células B periféricas (LDGCB 79% e LF 50%). A associação de EBV em linfomas indolentes são infrequentes, e menor especificidade ao folicular. KOREISHI et al. (2011) descrevem caso isolado de linfoma folicular (grau 3A), com EBER positivo focalmente, e raras células HHV8 coinfectadas e paciente HIV negativo. Na classificação histológica mais atual, os esforços são para delinear tipos de linfomas que são mais comuns ou prevalentes a infecção ao HIV, entre eles, para pacientes imunocompetentes (LDGCB centrolástico e imunoblástico). BIBAS e ANTINORI (2009) descrevem, segundo critérios da OMS (2008) que

pacientes com LDGCB imunoblásticos geralmente possuem imunossupressão grave, e com elevada frequência de EBV (80-90%), sendo menor para centrobástico (30-40%).

Neste caso, podemos sugerir pela expressão de EBV em 79% dos casos soropositivos ao HIV/LDGCB, para aqueles do subtipo imunoblástico, sendo menos frequente a infecção de pacientes por HIV e coinfectados ao EBV, em linfomas Foliculares (50%). Os linfomas fortemente associados ao HIV (PEL e Plasmabástico) foram menos expressivos em nosso estudo, não associados ao EBV.

Sugere-se que o EBV tem papel na linfomagênese de pacientes HIV imunocomprometidos, e implicados em doenças linfoproliferativas de Hodgkin e não Hodgkin de células B, com doenças sistêmicas (BIBAS e ANTINORI 2009). Assim, a coinfeção de pacientes soropositivos ao HIV e infectados por EBV não é exclusiva em nosso estudo (WOOD e HARRINGTON 2005). E, a associação do HIV em linfomas foi incorporada por centros preventivos e de controles, desde 1985 nos Estados Unidos (HARNLY et al. 1988), sendo alvo de estudos moleculares e clínicos, ou de susceptibilidade a neoplasias de origem linfóide.

A partir dessa época modelos patogénicos foram formados para entender o papel de EBV como infecção oportunista em pacientes HIV positivos, sendo relacionado à atividade proliferativa de clones transformados, e possivelmente de forma semelhante em pacientes com imunodeficiência, em modelo animal e *in vitro* por células B infectadas ao EBV imortalizadas e com expansão monoclonal com vantagem proliferativa

(MCCUNE 1991; BASHIR et al. 1991). Outros modelos sugerem proliferação policlonal B transformadas por acúmulo mutacional, e relacionados ao descontrole do sistema imune (GRULICH et al. 2000).

O risco de deficiência imune em linfomas B é alvo para estudos de respostas imunológicas, como por contagem do número de CD4/T circulantes (GROGG et al. 2007). É sugestivo que o escape de células tumorais do sistema de defesa imunológico é devido à presença de EBV em pacientes HIV positivos (DA SILVA SR 2011).

O estudo de coinfeção viral entre HIV e EBV em linfomas, sem dúvida, pode favorecer entendimentos sobre imunodeficiência, imunossupressão e respostas imunes. Em pacientes nestas condições clínicas são alvo para estudos de práticas terapêuticas, na busca de melhor resposta aos tratamentos (TAYLOR e BLACKBOURN 2011).

A persistência viral com dupla coinfeção EBV+HCV é associada à linfomas não Hodgkin como descrito por RICHIARDI et al. (2010), com sugestiva infecção em células mononucleares. Em nosso estudo, observamos apenas 2 casos com coinfeção a esses vírus associados aos pacientes soropositivos ao HIV com diagnóstico de LDGCB, masculinos e com doença avançada, de origem nacional (nordeste) e italiana.

Como característica forte dos nossos pacientes com linfomas e dupla coinfeção viral (EBV+HIV) foi para o gênero masculino, etnia branca, da sudeste do país. HARNLY et al. (1988) concordam com nossos resultados quanto ao gênero, e descrevem ainda que houve aumento de prevalência viral entre 1980-1985 em pacientes adultos jovens (25-44anos) com linfomas

não Hodgkin. Nossos resultados foram discordantes quanto ao período de diagnóstico (2000-2008) e idade (mediana de 60 anos). E, foi comum a idade adulta jovem em pacientes com linfoma de Hodgkin.

Pudemos constatar que os pacientes HIV e EBV positivos tiveram como características clínicas, doença mais avançada, sintomas B, alta frequência de óbitos pela doença (LDGCB) e prognóstico mais favorável e pacientes vivos com LH. KAPLAN et al. (1989) associaram pacientes com linfomas B a doença avançada (67%; n=84), com coinfeção ao EBV em 33% dos casos (5/15).

Em nosso estudo 73% dos pacientes com LDGCB apresentaram doença avançada e óbitos (82%). LEVINE et al. (1991) descrevem semelhante consideração clínica para pacientes com linfomas B (estádio clínico avançado e índices de prognósticos menos favoráveis), sendo que os de melhor prognóstico e resposta terapêutica tiveram favorável sobrevida, sugerindo ainda patogênese da doença pela presença de infecção ao HIV antes do diagnóstico ($p=0.04$).

No total dos casos positivos em linfomas de Hodgkin as frequências de coinfeção foram maiores em ENOD (50%) e CM (43%), com 7% em DL, sendo comum a prevalência de HIV em pacientes com ENOD (0-40%) e CM (41-100%), mencionado por BARRETO (2002), em estudo revisional. Como característica clínica 64% desses pacientes, em nosso estudo, tiveram doença avançada e sintomas B, com bom prognóstico, e vivos no último retorno clínico (71%).

Nossos dados são concordantes aos mencionados por BARRETO (2002) que descreve características comuns aos pacientes com linfoma de Hodgkin HIV positivos, para alta frequência de sintomas B (70-96%) e estágio clínico *Ann Arbor* III-IV (74-92%), com alterações imunológicas que comprometem a resposta terapêutica. Nossos dados mostram frequência um pouco menor para pacientes com doença avançada e boa resposta terapêutica, com alta taxa de sobrevida.

Os pacientes HIV positivos dependem da resposta à quimioterapia de acordo com o estado imune, e o advento das terapias retrovirais e regimes profiláticos para doenças oportunistas (Toxoplasmose, Citomegalovírus, Pneumonia) aumentaram o tempo de vida dos pacientes HIV positivos, sendo estimado no passado frequências entre 8-27% desses pacientes com diagnóstico de linfoma não Hodgkin no ano de 1992 (GAIL et al. 1991). A maioria dos pacientes de nosso estudo tiveram tratamentos terapêuticos (73% em LDGCB, com 45% CHOP; 86% em LH com ABVD, MOPP-ABV), com mediana de seguimento clínico maior para os pacientes com linfoma de Hodgkin (50 meses) e menor para o não Hodgkin (3 meses).

A compreensão do envolvimento de EBV no processo de imortalização e transformação maligna de células B se torna alvo importante para delinear novas estratégias terapêuticas, embora na atualidade, haja propostas terapêuticas mais eficientes para a doença e anti-retrovirais.

5.4 LINFOMAS T E EBV

Tumores malignos de origem de células T, T/NK nasal apresentam heterogênea característica clínica, patológica e de associação ao EBV. São tumores raros, e na prática clínica é pobre a resposta terapêutica. No total de nosso estudo, notamos semelhante descrição e frequências de EBV maior para o tipo T-NK Nasal, Angioimunoblástico.

Segundo revisional proposto por CHIATTONE (2009) o linfoma extranodal de células T/NK tipo nasal ocorre mais frequentemente em países orientais e outras populações nativas, mais raras, da América Central e do Sul com preferencial localização de cavidade nasal e seios paranasais. O padrão de disseminação inclui pele, testículo, SNC e trato digestivo. Essas características foram comuns em nossos achados, com apenas um caso com disseminação de pele EBV positivo.

A frequência de EBV nesse linfoma foi maior, em relação aos outros linfomas de origem de células T descritos no estudo, com 81,3% de expressão ao EBV e em adultos jovens (53,3%), masculinos e de etnia branca (62%). A expressão viral em nosso estudo para o linfoma foi menor, em relação ao descrito por ISOBE et al. (2012). Nos casos adultos jovens encontraram expressão de 71,4% de EBV, e sugere-se que seja agente causal para a doença por constatarem infecção passada por Mononucleose, embora rara em crianças japonesas.

A infecção e reativação de EBV podem ocorrer em consequência de disfunção imune, e seu papel tumoral por meio de modular receptores de

membrana e secreções parácrinas de citocinas, quimiocinas ou na sobrevivência de células malignas, favorecendo progressão da doença (HSU e HSU 1994).

Clinicamente os pacientes desse estudo mostrou baixa eficiência terapêutica, e a maioria dependeu do esquema CHOP, como em linfomas T/NK nasal (38%), sendo comum o uso de esquemas heterogêneos, constatando-se grande número de óbitos (38%) ou vivos com a doença (54%), com mediana de seguimento clínico curto (15 meses). Estas descrições são concordantes ao estudo revisional mencionado por CHIATTONE (2009) em relação a alta resistência a quimioterapia e com prognóstico pobre.

ITO et al. (2012) propõem um novo regime quimioterápico com o uso de metotrexato, esteroide, ifosfamida, L-asparaginase e etoposide (SMILE) com promissor resultado (Fase II), tendo-se como medida quantitativa a frequência de EBV em sangue periférico por (RT-PCR). Fato semelhante foi constatado em outro estudo japonês onde descrevem o uso de L-asparaginase em pacientes com transplantes alogênicos obtendo-se melhor evolução e resposta à terapia (ISOBE et al. 2012).

Outro linfoma de origem T que tivemos maior frequência de EBV foi para o tipo Angioimunoblástico, com menor casuística aos T/NK Nasal (10 Vs 16) com positividade ao EBV em 40% dos casos. Esses pacientes tiveram como característica a idade adulta madura (mediana 66anos) e diagnóstico nodal DELFAU-LAURE et al. (2012) descrevem que é comum a frequência de EBV nesse linfoma em gânglios cervicais ($p < 0004$) e células

tumorais circulantes ($p=0.0019$), sendo expresso em linfócitos B (CD20+ em grandes blastos).

Clinicamente os pacientes de nosso estudo responderam mal ao esquema CHOP, com infrequente tratamento nos casos EBV positivos e 50% de óbitos. O uso de esquema CHOP-R tem elevado a taxa de sobrevida desses pacientes, livres de progressão (42%) e sobrevida global (62%), em fase II de estudo clínico (DELFAU-LAURE et al. 2012).

5.5 LINFOMAS E HHV8

No total do estudo foi infrequente a detecção de HHV8 com 0,2% de expressão em linfomas (6/2592), e no total de linfomas não Hodgkin a frequência foi de 0,3% (6/1712), não se tendo presença viral em linfomas de Hodgkin ($n=880$). O método eficiente para a detecção foi o de imunistoquímica (83%), com expressão em pacientes com LDGCB (0,3%; 3/863), Folicular (0,7%; 2/305) e 25% em Plasmablástico (1/4).

Pacientes com linfoma LDGCB e Folicular foram estadiados para doença avançada, presença de sintomas B e prognóstico favorável (IPI 0-2); vivos no último retorno clínico e com remissão completa ao tratamento CHOP, combinado a radioterapia. Em LDGCB os pacientes eram homens em sua maioria e em Folicular, exclusivo em mulheres.

FERRY et al. (2009) observaram a presença viral de HHV8 em linfomas B de Grandes Células, em tipos classificados como GCB intravascular e outro em linfoma de Hodgkin "Like" coinfestado ao EBV.

RIMAR et al. (2006) propõem relação de HHV8 como infecção oportunista, com especificidade topográfica (endotélios). Em nosso estudo a coinfeção de HHV8+EBV foi percebida em 67% dos casos (2/3), e um deles com tripla detecção viral (HHV8+EBV+SV40), a maioria em linfonodos cervicais.

As associações virais de EBV e HHV8 em linfomas têm sido implicadas a infecção latente de células B, conforme modelos em estudos *in vitro* com observação de imortalização de células B infectadas por EBV expressando proteínas latentes ao longo das gerações de células em cultura, descritos por KLICHE et al. (1998).

Em um caso Plasmablástico adulto jovem, masculino positivo ao HHV8 foi negativo ao HIV, e o oposto para efusão primária (PEL), que são descritos como tipos histológicos mais envolvidos a pacientes com imunodeprimidos HIV positivos.

Os pacientes positivos HHV8 apresentaram boa resposta terapêutica ao esquema CHOP, sem evidência da doença, embora estadiados com doença avançada, e poucos casos com recidivas, tiveram remissão clínica em seguimento clínico superior a 5 anos.

5.6 LINFOMAS E SV40

A associação de SV40 na etiologia da doença e nos mecanismos de transformação maligna é controversa (SHAH 2007; POULIN e DECAPRIO 2006). Em estudos *in vitro* essa relação tem sido associada à imortalização celular interferindo na atividade de telomerase (FODDIS et al. 2002). E, em

transformação celular *in vitro* pela expressão do antígeno t (pequeno ou Tag) e grande (TAg), agindo de forma cooperada (HAHN et al. 2002; RANGARAJAN et al. 2004).

Entre as habilidades para a transformação celular, sugere-se a ação de TAg em se ligarem a proteínas supressoras tumorais p53 e pRB, levando ao descontrole do ciclo celular, proliferação e apoptose. E, a baixa detecção viral pode depender da incorporação do genoma viral em cromossomos de células hospedeiras ou sua presença na forma episomal (POULIN e DECAPRIO 2006).

Nossos resultados mostram associação aos linfomas com baixa expressão viral de Tag em 0,7% do total de pacientes avaliados (19/2693). A positividade detectada foi exclusiva pelo método de hibridização *in situ*, com ausência de expressão cruzada aos poliomavirus BKV e JCV, que apresentam homologia genômica, sugerida por VISCIDI et al. (2003), em estudos com imunoenaios enzimáticos.

Em linfomas de Hodgkin tivemos 1,4% (10/716) de expressão de SV40, em pacientes de idade pediátrica (mediana 11,1 anos). MENESES et al. (2005) descrevem alta prevalência viral em pacientes com a doença pelo método de imunistoquímica com menor casuística, em comparação aos nossos dados (10%; 2/19). A coinfeção ao EBV ocorreu em 50% (5/10) dos casos positivos ao SV40, e este exclusivo ao subtipo ENOD (10/495; 2%).

PATEL et al. (2008) em estudo pediátrico para o linfoma detectaram 8,3% (29/351) de positividade ao SV40 pelo método de PCR, com maior presença do vírus em tonsilas, ausente o poliomavírus JCV e um caso

positivo ao BKV. A coinfeção ao EBV foi percebida em 3,1% dos casos. Houve diferença entre a idade pediátrica de casos positivos e negativos ao SV40, sendo maior para os de idade maior que 9,3 anos ($p < 0.0001$).

SHAH et al. (1971) detectaram anticorpos de SV40 em crianças que nasceram depois de 1964, sugerindo que a infecção pode ser independente da vacinação de poliomielite exposta a contaminação viral, sendo o oposto sugerido por MENESES et al. (2005) em pacientes da Costa Rica com linfoma de Hodgkin com alta incidência populacional para vacinação de polivacinas contaminadas em épocas passadas (décadas de 50 e 60).

A maioria de nossos pacientes foi diagnosticada entre o ano 2000-2008 (70%), com alta frequência em linfonodos cervicais (90%). Clinicamente com estágio clínico *Ann Arbor* I-II e de melhor prognóstico IPI de 0-2, em 75% dos casos (6/8), com 25% com doença avançada e sintomas B. Todos considerados vivos e com alta frequência para os sem doença (60%). O tratamento terapêutico foi comum para ABVD (75%). Dados semelhantes não foram encontrados na literatura.

Em linfomas não Hodgkin a frequência viral no total de estudo foi de 0,6% (9/1549), semelhante aos casos de Hodgkin. A expressão viral foi exclusiva em subtipo histológico LDGCB com menor frequência aos casos de ENOD (1,1%; 9/847). De forma semelhante aos linfomas de Hodgkin, a maioria dos pacientes eram masculinos (89%), e se diferenciam por apresentar idade adulta (44% > 60 anos; 56% entre 19-60 anos), com inferior frequência de coinfeção ao EBV (11,1%; 1/9).

MENESES et al. (2005) mencionam que a detecção da sequência Tag do vírus SV40 pode ser mais frequente em LNH B (em centro germinativo; 64%), e a escolha dos métodos de estudos podem conferir diferenças de expressão viral, como por PCR e HIS descritos por grupo japonês em tecidos de LDGCB (NAKATSUKA et al. 2003). VILCHEZ et al. (2005) referem a expressão de SV40 em centros germinativos de linfomas de Grandes Células B (83%) e menos frequente ao EBV (46%; $p=0.05$), em pacientes HIV positivos. Com o exposto, na atualidade, ainda há discrepâncias de consenso da melhor metodologia para a detecção ao vírus e sua relação à patobiologia dos linfomas.

AMARA et al. (2008) promovem discussões interessantes quanto a patogênese de LDGCB sugerindo associação ao vírus SV40 em pacientes da Tunísia. Nos casos com translocações $t(14;18)$ houve frequência de grande presença de cópias virais (71%) em centro germinativo. Esses pacientes tiveram taxas de sobrevida mais curta, mas sem relação ao status de SV40. Nossos resultados também mostraram que a maioria dos pacientes tiveram seguimento clínico curto 62,5% (mediana de 12m; 5/8), com 50% de óbitos e entre os vivos 75% não apresentaram doença em atividade e com remissão clínica, em sua maioria, após o uso de esquema CHOP (75%).

Estudos associam SV40 a imunossuprimidos em desordens linfoproliferativas (VILCHEZ et al. 2006), e não tivemos casos HIV positivos nos linfomas com expressão ao SV40 e, em geral, com boa resposta terapêutica.

6 CONCLUSÕES

Nossos dados permitem concluir que:

1. Houve mudança no padrão histopatológico e da relação do LHc com o EBV nos períodos estudados, caminhando-se no sentido de igualar populações procedentes da região sul-sudeste brasileiro ao perfil dos países mais desenvolvidos;
2. Os presentes dados de frequência da relação do EBV com os aspectos demográficos e patológicos dos LH, linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e linfoma de Burkitt corroboram estudos nacionais anteriores em séries com menores números de casos;
3. Foi apoiado o valor prognóstico desfavorável da presença do EBV em pacientes com LHc e com menos de 45 anos.
4. Nossos dados não permitem atribuir valor prognóstico da expressão de EBV em pacientes mais velhos com LDGCB e LHc, ao contrário para pacientes com linfoma Folicular (LF);
5. O impacto de EBV em pacientes com LHc com idade superior à 45 anos parece sugerir efeito protetor, sendo necessárias análises complementares multivariadas para melhor elucidar este resultado que difere a descrições de estudos norte americanos.
6. O impacto de EBV na sobrevivência de pacientes com idade superior a 45 anos em LF demanda estudos futuros, que possibilitem análise da associação viral ao perfil clínico (IPI, estágio clínico e terapêutica);

7. A baixa frequência da expressão de HHV8 e SV40 em nossos casos permite concluir que a importância de seu estudo em linfomas malignos deva ser muito restrita.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboulafia DM, Pantanowitz L, Dezube BJ. AIDS-related non-Hodgkin lymphoma: still a problem in the era of HAART. **AIDS Read** 2004; 14:605-17.

Abreu ES, Ferreira FVA, Rocha-Filho FD, et al. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no Estado do Ceará e sua relação com o vírus de Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análises morfológica, imuno-histoquímica e por hibridização *in situ*. **J Bras Patol** 1997; 33:178-84.

Aisenberg AC. Historical review of lymphomas. **Br J Haematol** 2000; 109:466-76.

Aktas S, Kargi A, Olgun N, Diniz G, Erbay A, Vergin C. Prognostic significance of cell proliferation and apoptosis-regulating proteins in Epstein barr vírus positive and negative pediatric non Hodgkin's lymphoma. **Pathol Oncol Res** 2009; 15:345-50.

Alter A. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. **J Hepatol** 2006; 44(1 Suppl):S6-9.

Amara K, Trimeche M, Ziadi S, et al. Presence of simian virus 40 in diffuse large B-cell lymphomas in Tunisia correlates with germinal center B-cell immunophenotype, t(14;18) translocation, and P53 accumulation. **Mod Pathol** 2008; 21:282-96.

Ambinder RF, Weiss LM. Association of Epstein-Barr virus with Hodgkin's disease: In: Mauch PM, Armitage JO, Diehl V, Hoppe RT, Weiss LM, editors. **Hodgkin's disease**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p.79-98.

Armstrong AA, Alexander FE, Paes RP, et al. Association of Epstein-barr virus with pediatric Hodgkin's disease. **Am J Pathol** 1993; 142:1683-8.

Anagnostopoulos I, Hummel M, Finn T, et al. Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. **Blood** 1992; 80:1804-12.

Anagnostopoulos I, Hummel M. Epstein-Barr virus in tumors. **Histopathology** 1996; 29:297-315.

Andriko JA, Aguilera NS, Nandedkar MA, Abbondanzo SL. Childhood Hodgkin's disease in the United States: an analysis of histologic subtypes and association with Epstein-Barr virus. **Mod Pathol** 1997; 10:366-71.

Araujo I, Foss HD, Bittencourt A, et al. Burkitt's lymphoma in Northeast Brazil: expression of Epstein-Barr virus-gene products in Burkitt's lymphoma in Northeastern Brazil. **Blood** 1996; 87:5279-86.

Araujo I, Bittencourt AL, Barbosa HS, et al. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. **Virchows Arch** 2006; 449:315-9.

Araujo LHL, Victorino APOS, Assad DX, et al. Linfoma não Hodgkin de alto grau, revisão da literatura. **Rev Bras Cancerol** 2008; 54:175-83.

Bacchi CE, Bacchi MM, Rabenhorst SH, et al. Aids-related lymphoma in Brazil: Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus. **Am J Clin Pathol** 1996a; 105:230-7.

Bacchi MM, Bacchi CE, Alvarenga M, Miranda R, Chen YY, Weiss LM. Burkitt's lymphoma in Brazil: strong association with Epstein-Barr virus. **Mod Pathol** 1996b; 9:63-7.

Ballestas ME, Kaye KM. The latency associated nuclear antigen a multifunctional protein central to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. **Future Microbiol** 2011; 6:1399-413.

Balmain A, Gray, J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. **Nat Genet** 2003; 33:238-44.

Barreto L. Doença de Hodgkin e AIDS. **Rev Bras Cancerol** 2002; 48:389-99.

Barros MH, Scheliga A, De Matteo E, et al. Cell cycle characteristics and Epstein barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients. **Leuk Lymphoma** 2010; 51:1513-22.

Bashir R, Okano M, Kleveland K, et al. SCID/human mouse model of central nervous system lymphoproliferative disease. **Lab Invest** 1991; 65:702-9.

Bazze F, Rihani R, Howard S, Sultan I. Comparing adult and pediatric Hodgkin lymphoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1988-2005: an analysis of 21 734 cases. **Leuk Lymphoma** 2010; 51:2198-207.

Bello C, Sotomayor EM. Monoclonal antibodies for B-cell lymphomas: ritiximab and beyhond. **Hematol Am Soc Hematol Educ Program** 2007; 233-42.

Bennett MH, Tu A, Hudson GV. Analysis of grade 1 Hodgkin's disease (Report no 6). **Clin Radiol** 1981; 32:491-8.

Bibas M, Antinori A. EBV and HIV-Related Lymphoma. **Mediterr J Hematol Infect Dis** 2009; 1:e2009032.

Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. **J Infect Dis** 2000; 181:1562-8.

Boccardo E, Villa LL. Vírus e câncer. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.123-32.

Boffetta P. Epidemiology of peritoneal mesothelioma: a review. **Ann Oncol** 2007; 18:985-90.

Bornkamm GW (2009) Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: More questions than answers. **Int. J. Cancer** 2009; 124:1745–1755.

Boshoff C, Schulz TF, Kennedy MM, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infects endothelial and spindle cells. **Nat Med** 1995; 1:1274-8.

Boulangier EL. Human herpesvirus 8 (HHV-8): I. Characteristics and epidemiology. **Ann Biol Clin** 1998; 56:643-50.

Brousset P, de Araujo V, Gascoyne RD. Immunohistochemical investigation of SV40 large T antigen in hodgkin and non-hodgkin's lymphoma. **Int J Cancer** 2004; 112:533-5.

Büyükpamukçu M, Atahan L, Çağlar M, Kutluk T, Akyüz C, Hazar V. Hodgkin's disease in Turkish children: clinical characteristics and treatment results of 210 patients. **Pediatric Hematol Oncol** 1999; 16:119-29.

Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond evolving concepts and practical applications. **Blood** 2011; 117:5019-32.

Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Schulz TF. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. **Blood** 2008a, 113:1213-24.

Carbone A, Gloghini A, Dotti G. EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. **Oncologist** 2008b, 13:577-85.

Carbone A, Spina M, Gloghini A, Tirelli U. Classical Hodgkin's arising in different host's conditions: pathobiology parameters, therapeutic options, and outcome. **Am J Hematol** 2011; 86:170-9.

Carbone M, Rizzo P, Pass HI. Simian Virus 40, poliovaccines and human tumors: a review of recent developments. **Oncogene** 1997; 15:1877-88.

Carbone M, Kratzke RA, Testa JR. The pathogenesis of mesothelioma. **Semin Oncol** 2002; 29:2-17.

Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Paydas S, Winer ES, Butera JN. Epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: what we know so far. **Oncologist** 2011; 16:87-96.

Catalano A, Iland H. Molecular biology of lymphoma in the microarray. **Pathology** 2005; 37:508-22.

Caterino-de-Araújo A. Human herpesvirus 8 group B and C variants circulating in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis** 1998; 177:1136-7.

Chabay PA, Barros MH, Hassan R, et al. Pediatric Hodgkin lymphoma in 2 South American series: a distinctive epidemiologic pattern and lack of association of Epstein barr virus with clinical outcome. **J Pediatr Hematol Oncol** 2008; 30:285-91.

Chabay P, Lara J, Lorenzetti M, et al. Epstein barr virus in relation to apoptosis markers and patients outcome in pediatric B-cell non-hodgkin lymphoma. **Cancer Letters** 2011; 307:221-6.

Chagas CA, Endo LH, Sakano E, Pinto GA, Brousset P, Vassallo J. Detection of herpesvirus type 8 (HHV8) in children's tonsils and adenoids by immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 2006; 70:65-72.

Chang KL, Albújar PF, Chen YY, Johnson RM, Weiss LM. High prevalence of Epstein-Barr in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. **Blood** 1993; 81:496-501.

Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science** 1994; 266:1865-9.

Chiatton CS. Linfoma extranodal de células NK/T tipo nasal. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2009; 31:26-9.

Chindamo M, Spector N, Segadas JA, et al. Prevalence of hepatitis C infection in patients with non Hodgkin's lymphomas. **Oncol Rep** 2002 9:657-9.

Claviez A, Tiemann M, Lüders H, et al. Impact of latent Epstein-Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol** 2005; 23:4048-56.

Connors JM, Klimo P, Adams G, et al. Treatment of advanced Hodgkin's disease with chemotherapy comparison of MOPP/ABV hybrid regimen with alternating courses of MOPP and ABVD: a report from the national cancer institute of Canada Clinical trials group. **J Clin Oncol** 1997; 15:1638-45.

Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic pattern of Hodgkin's disease. **Int J Cancer** 1971; 8:192-201.

Coupland SE, Charlotte F, Mansour G, Maloum K, Hummel M, Stein H. HHV-8 associated T-cell lymphoma in a lymph node with concurrent peritoneal effusion in a HIV-positive man. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:647-52.

Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2001; 29; 356:461-73.

D'Souza BN, Edelstein LC, Pegman PM, et al. Nuclear factor kappa B-dependent activation of the antiapoptotic bfl-1 gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. **J Virol** 2004; 78:1800-16.

da Silva MC, Zuccherato LW, Lucena FC, et al. Extensive admixture in Brazilian sickle cell patients: implications for the mapping of genetic Modifiers. **Blood** 2011; 118:4494-5.

da Silva SR, de Oliveira DE. HIV, EBV and KSHV: viral cooperation in the pathogenesis of human malignancies. **Cancer Lett** 2011; 305:175-85.

De Leval L, Gaulard P. Pathology and biology of peripheral T-cell lymphomas. **Histopathology** 2011; 58: 49-68.

Delfau-Laure MH, de Leval L, Joly B, et al. Targeting intratumoral B-cells with Rituximab in addition to CHOP in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. A clinicobiological study of the GELA. **Haematologica** 2012; Feb 27. [Epub ahead of print].

Deyrup AT. Epstein-Barr virus-associated epithelial and mesenchymal neoplasms. **Hum Pathol** 2008; 39:473-83.

Diepstra A, van Imhoff GW, Schaapveld M, et al. Latent-Barr infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. **J Clin Oncol** 2009; 27:3815-21.

Duggan DB, Petroni GR, Johnson JL, et al. Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. **J Clin Oncol** 2003; 21:607-14.

Dupin N, Diss TL, Kellam P, et al. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Cattleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. **Blood** 2000; 95:1406-12.

Edelman DC Human herpesvirus 8--a novel human pathogen. **Virology** 2005; 2:78.

Ekström-Smedby K. Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma. A review. **Acta Oncol** 2006; 45:258-71.

Elgui de Oliveira D, Bacchi MM, Abreu ES, Niero-Melo L, Bacchi CE. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection. **Am J Clin Pathol** 2002; 118:25-30.

Engel M, Essop MF, Close P, Hartley P, Pallesen G, Sinclair-Smith C. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. **J Clin Pathol** 2000; 53:182-6.

Engels EA Infections agents as causes of non Hodgkin lymphoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2007; 16:401-4.

Evans AS, Gutensohn NM A population-based case control study of EBV and other viral antibodies among persons with Hodgkin's disease and their siblings. **Int J Cancer** 1984; 34:149-57.

Ertem U, Duru F, Dağdemir A, et al. Hodgkin's disease in 82 Turkish children diagnosed over 10-year period. **Pediatric Hematol Oncol** 1997; 14:359-66.

Faria SL, Vassallo J, Cosset JM, Brandalise SR. Childhood Hodgkins disease in Campinas. **Med Pediatr Oncol** 1996; 26:90-4.

Farrell K, Jarrett RF The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. **Histopathology** 2011; 58:15-25.

Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH The ins and outs of EBV infection. **Trends Microbiol** 2000; 8:185-9.

Ferreira JM, Klumb CE, Reis RD, et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: first report from Brazil. **Cancer Epidemiol** 2012 Apr 30. [Epub ahead of print]

Ferry JA, Sohani AR, Longtine JA, Schwartz RA, Harris NL HHV8-positive, EBV positive Hodgkin lymphoma like large B cell lymphoma and HHV8-positive intravascular large B cell lymphoma. **Mod Pathol** 2009; 22:618-26.

Flavell KJ, Biddulph JP, Constandinou CM, et al Variation in the frequency of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease with age. **Leukemia** 2000; 14:748-53.

Foddis R, De Rienzo A, Broccoli D, et al. SV40 infection induces telomerase activity in human mesothelial cells. **Oncogene** 2002; 21:1434-42.

Forstpointer R, Unterhalt M, Dreyling M, et al. Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). **Blood** 2006; 108:4003-8.

Freitas RB, Freitas MR, Linhares AC. Prevalence of Human Herpesvirus 8 antibodies in the population of Belém, Pará, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2002; 44:309-13.

Gail MH, Pluda JM, Rabkin CS, et al. Projections of the incidence of non-Hodgkin's lymphoma related to acquired immunodeficiency syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83:695-701.

Gao SJ, Kingsley L, Li M, et al. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. **Nat Med** 1996; 2:925-8.

Garcia CF, Swerdlow SH. Best practices in contemporary diagnostic immunohistochemistry. panel approach to hematolymphoid proliferations. **Arch Pathol Lab Med** 2009;133:756-65.

Geissinger E, Bonzheim I, Krenács L, et al. Nodal peripheral T-cell lymphomas correspond to distinct mature T-cell populations. **J Pathol** 2006; 210:172-80.

Ghosh SK, Perrine SP, Faller DV. Advances in virus-directed therapeutics against Epstein Barr Virus associated malignancies. **Adv Virol** 2012; 2012:509296.

Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. **Int J Cancer** 1997; 70:375-82.

Grogg KL, Miller RF, Dogan A. HIV infection and lymphoma. **J Clin Pathol** 2007; 60:1365-72.

Gulich AE, Wan X, Law MG, et al. B cell stimulation and prolonged immune deficiency are risk factors for non-Hodgkin's lymphoma in people with AIDS. **AIDS** 2000; 14:133-40.

Gulley ML, Raab-Traub N. Detection of Epstein-Barr virus in human tissues by molecular genetic techniques. **Arch Pathol Lab Med** 1993; 117:1115-20.

Gulley ML, Eagan PA, Quintanilla-Martinez L, et al. Epstein-Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and Hispanic American ethnicity. **Blood** 1994; 83:1595-602.

Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, et al. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. **Mol Cell Biol** 2002; 22:2111-23.

Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G, Franzmann MB, et al. Aids-related lymphoma: histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-barr virus as demonstrated by *in situ* nucleic acid hybridization. **Am J Pathol** 1991; 138:149-63.

Hannachi N, Ben Fredj N, Samoud S, et al. Serorevalence and risk factors of human herpes virus 8 infection in central east tunisia. **Pathol Biol** 2011; Nov 22. [Epub ahead of print]

Harnly ME, Swan SH, Holly EA, Kelter A, Padian N. Temporal trends in the incidence of non-Hodgkin's lymphoma and selected malignancies in a population with a high incidence of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Am J Epidemiol** 1988; 128:261-7.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood** 1994; 84: 1361-1392.

Harris N. The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we learned from its pathology? **Ann Oncol** 1998; 9:45-56.

Hassan R, Klumb CE, Felisbino FE et al. Clinical and demographic characteristics of Epstein-Barr virus-associated childhood Burkitt's lymphoma in Southeastern Brazil: epidemiological insights from an intermediate risk region. **Haematology** 2008; 93:780-783

Heinsohn S, Scholz RS, Kabish HH SV40 and p53 as team players in childhood lymphoproliferative disorders. **Int J Oncol** 2011; 38:1307-17.

Herbest H, Dallenbach F, Hummel M, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed Sternberg cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88:4766-70.

Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. **N Engl J Med** 2003; 349:1324-32.

Hoeller S, Tzankov A, Pileri SA, Went P, Dirnhofer S. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. **Hum Pathol** 2010; 41, 352-7.

Hofscheier A, Ponciano A, Bonzheim I, et al. Geographic variation in the prevalence of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population. **Mod Pathol** 2011; 24:1046-54.

Huang X, Nolte I, Gao Z, et al. Epidemiology of classical Hodgkin lymphoma and its association with Epstein Barr virus in Northern China. **PLoS ONE** 2011; 6:e21152.

Hsu SM, Hsu PL. Autocrine and paracrine functions of cytokines in malignant lymphomas. **Biomed Pharmacother** 1994; 48:433-44.

Hsu SC, Metzger ML, Hudson MM, et al. Comparison of treatment outcomes of childhood Hodgkin lymphoma in two US centers and a center in Recife, Brazil. **Pediatr Blood Cancer** 2007; 49:139-44.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **Epstein-Barr Virus**. 1997. Available from: <URL:<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B-6.pdf>> [2012 july 13]

Isoobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, et al. T/NK cell type chronic active Epstein-Barr virus disease in adults: an underlying condition for Epstein-Barr virus-associated T/NK-cell lymphoma **J Clin Pathol** 2012; 65:278-82.

Ito Y, Kimura H, Maeda Y, et al. Pretreatment EBV-DNA copy number is predictive of response and toxicities to SMILE chemotherapy for extranodal NK/T cell lymphoma, nasal type. **Clin Cancer Res** 2012; 18:4183-90.

Iwakiri D, Takada K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. **Adv Cancer Res** 2010; 107:119-36.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. **Blood** 2008; 112:4384-99.

Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research **Hematol Am Soc Hematol Educ Program** 2009; 523-31.

Jarrett RF. Viruses and Hodgkin's lymphoma. **Ann Oncol** 2002; 13 Suppl 1:23-9.

Jarrett RF. Viruses and lymphoma/leukemia. **J Pathol** 2006; 208:176-86.

Jeong SH. HBV infection as a risk for non-Hodgkin lymphoma. **Lancet Oncol** 2010; 11:806.

Kaplan LD, Abrams DI, Feigal E, et al. AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma in San Francisco. **JAMA** 1989; 261:719-24.

Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. **Nat Med** 1996; 2:918-24.

Keegan THM, Glaser SL, Clark CA, et al. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's Lymphoma: a population-based study. **J Clin Oncol** 2005; 23:7604-12.

Klein G, Powers A, Croce C. Association of SV40 with human tumours. **Oncogene** 2002; 21:1141-9.

Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. **Nat Rev Immunol** 2008; 8:22-33.

Kliche S, Kremmer E, Hammerschmidt W, Koszinowski U, Haas J. Persistent infection of Epstein-Barr virus-positive B lymphocytes by human herpesvirus 8. **J Virol** 1998; 72:8143-9.

Kluin P, Schuurin E. Molecular cytogenetics of lymphoma: where do we stand in 2010? **Histopathology** 2011; 58:128-44.

Klumb CE, Hassan R, Elgui de Oliveira D et al. Geographic variation in Epstein-barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. **Int J Cancer** 2004; 108:66–70.

Koreishi AF, Saenz AJ, Arcila ME, Hedvat C, Fleming S, Teruya-Feldstein J. Synchronous follicular lymphoma, kaposi sarcoma, and castleman's disease in a HIV-negative patient with EBV and HHV-8 coinfection. **Int J Surg Pathol** 2011; 19:685-91.

Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:15-27.

Laichalk LL, Hochberg D, Babcock GJ, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. **Immunity** 2002; 16:745-54.

Leão JC, Caterino-de-Araújo A, Porter SR, Scully C. Human Herpesvírus 8 (HHV-8) and the etiopathogenesis of Kaposi's Sarcoma. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo** 2002; 57:175-86.

Levi JA. Three new human herpesviruses (HHV6, 7, 8). **Lancet** 1997; 349:558-63.

Levine AM, Sullivan-Halley J, Pike MC, et al. Human immunodeficiency virus-related lymphoma. Prognostic factors predictive of survival. **Cancer** 1991; 68:2466-72.

Levine PH, Ablashi DV. An etiologic Perspective of the new herpesviruses: HHV-7 and HHV-8. **Infect Med** 1999; 16:24-34.

Li QX, Young LS, Niedobitek G, et al. Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system. **Nature** 1992; 356:347-50.

Liao JB. Viruses and human cancer. **Yale J Biol Med** 2006; 79:115-22.

Loureiro MM, Morais JC, Milito CB, Portugal RD, Pulcheri W, Spector N. Expression of Epstein-Barr virus in patients with Hodgkin's disease: report of 64 cases from Rio de Janeiro, Brazil. **J Bras Patol Med Lab** 2004; 40:37-40.

Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Kennedy RC. SV40 association with human malignancies and mechanisms of tumor immunity by large tumor antigen. **Cell Mol Life Sci** 2007; 64:803-14.

Luppi M, Torelli G. The new lymphotropic herpesviruses (HHV-6, HHV-7, HHV-8) and Hepatitis C virus (HCV) in human lymphoproliferative diseases: na overview. **Haematologica** 1996; 81:265-81.

Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, et al. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. **Int J Cancer** 1998; 77: 817-20.

McCune JM. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disease in mice and men. **Lab Invest** 1991; 65:377-80.

McGeoch DJ, Davidson A. The descent of herpesvirus 8. **Semin Cancer Biol** 1999; 9:201-9.

Meneses A, Lopez-Terrada D, Zanwar P, et al. Lymphoproliferative disorders in Costa Rica and simian virus 40. **Haematologica** 2005; 90:1635-42.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2009 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2008.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Mohammed IB, Briere J, Djebbara Z, Beldjord K, Andrieu J-M, Colonna P. Comparation of Epstein barr irus markers in reed-sternberg cells in adult hodgkin's disease tissue from an industrialized and a developing country. **Leuk Lymphoma** 1995; 17:163-8.

Monteiro TAF, Gomes MLC, Freitas RB, et al. Prevalência de anticorpos para o vírus de Epstein Barr em Belém, Pará, Brasil. **Rev Para Med** 1998; 12:8-12.

Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. **Blood** 2006; 107: 265-76.

Morton LM, Wang SS, Cozen W, et al. Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes. **Blood** 2008; 112: 5150-60.

Musacchio JG, Carvalho G, Morais JC, et al. Detection of free circulating Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with Hodgkin's disease. **São Paulo Med J** 2006; 124:154-7.

Nador RG, Cesarman E, Chadburn A, et al. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. **Blood** 1996; 88: 645-56.

Nakatsuka S, Liu A, Dong Z, et al. Simian virus 40 sequences in malignant lymphomas in Japan. **Cancer Res** 2003; 63:7606-8.

Naresh KN, Johnson J, Srinivas V, 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. **Ann Oncol** 2000; 11:91-6.

Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, et al. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. **Nat Med** 1997; 3:287-92.

Nicholas J. Evolutionary aspects of oncogenic herpesviruses. **Mol Pathol** 2000; 53:222-37.

Nogai H, Dörken B, Lenz G. Pathogenesis of Non-Hodgkin's Lymphoma. **J Clin Oncol** 2011; 29:1803-11.

Oguz A, Karadeniz C, Okur V, et al. Prognostic factors and treatment outcome in childhood Hodgkin disease. **Pediatr Blood Cancer** 2005; 45:670-5.

Ohshima K, Suzumiya J, Kikuchi M. The World Health Organization classification of malignant lymphoma: Incidence and clinical prognosis in HTLV-1-endemic area of Fukuoka. **Pathol Int** 2002; 52:1-12.

Oyama T, Yamamoto K, Asano N, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. **Clin Cancer Res** 2007; 13:5124-32.

Paes RAP, Teixeira RAP, Barrezuela LFM, Bruniera P. Três casos de carcinoma de nasofaringe associados ao vírus Epstein-barr (EBV) em crianças: aspectos clínicos, patológicos e imunohistoquímicos. **J Bras Patol** 1996; 32:76-82.

Pagano JS, Blaser M, Buendia MA, et al. Infections agents and câncer: criteria for a causal relation. **Semin Cancer Biol** 2004; 14:453-71.

Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumor cells of Hodgkin's disease. **Lancet** 1991; 337:320-2.

Patel NC, Vilchez RA, Killen DE, et al. Detection of polyomavirus SV40 in tonsils from immunocompetent children. **J Clin Virol** 2008; 43:66-72.

Pedrosa MF, Pedrosa F, Mecneide M, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood: clinical and epidemiological characteristics and survival analysis at a single center in Northeast Brazil. **J Pediatr** 2007; 83:547-554.

Pena SDJ, Di Pietro J, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE** 2011; 6:e17063.

Perna AM, Bonura F, Vitale F, et al. Antibodies to human herpes virus type 8 (HHV8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily. **Int J Epidemiol** 2000; 29:175-9.

Piccaluga PP, Agostinelli C, Tripodo C, et al.; for the European T-cell Lymphoma Study Group. Peripheral T-cell lymphoma classification: the matter of cellular derivation. **Expert Rev Hematol** 2011; 4:415-25.

Pizza M, Bruniera P, Luporini SM, et al. Detection of Epstein-Barr virus in children and adolescents with Burkitt's lymphoma by in situ hybridization using tissue microarrays. **Hematol** 2008; 13:114-8.

Poulin DL, DeCaprio JA. Is there a role for SV40 in human cancer? **J Clin Oncol** 2006; 24:4356-65.

Poppema S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. **Hematol Am Soc Hematol Educ Program** 2005; 231-8.

Pracchia LF, Buccheri V, Menezes Y, Siqueira SAC, Mori NS, Chamone DAF. Significado prognóstico dos graus histológicos do linfoma de Hodgkin do tipo esclerose nodular. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41:365-375.

Preston RJ. Molecular epidemiology: potential impacts on the assessment of public health. **Mut Res** 2003; 543:121-4.

Quadrelli C, Barozzi G, Riva D, et al. β -HHVs and HHV-8 in lymphoproliferative disorders. **Mediterr J Hematol Infect Dis** 2011; 3 e2011043.

Quintanilla-Martinez L, Lome-Maldonado C, Ott G, et al. Primary intestinal non-Hodgkin's lymphoma and Epstein-Barr virus: high frequency of EBV-infection in T-cell lymphomas of Mexican origin. **Leuk Lymphoma** 1998; 20:111-121.

Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species and cell type specific requirements for cellular transformation. **Cancer Cell** 2004; 6:171-83.

Razzouk BI, Gan YJ, Mendonça C, et al. Epstein-Barr virus in pediatric Hodgkin disease: age and histiotype are more predictive the geographic region. **Med Pediatr Oncol** 1997; 28:248-54.

Richiardi L, De Marco, L, Gillio-Tos A, et al. Persistent infection by HCV and EBV in peripheral blood mononuclear cells and risk of non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Epidemiol** 2010; 34:709-12.

Rimar D, Rimar Y, Keynan Y. Human herpesvirus-8: beyond Kaposi's. **Isr Med Assoc J** 2006; 8:489-93.

Rizvi MA, Evens AM, Tallman MS, Nelson, BP, Rosen ST. T-cell non-Hodgkin lymphoma. **Blood** 2006; 107:1255-64.

Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. **Ann Oncol** 2007; 18 Suppl 1:i3-i8.

Roman E, Smith AG. Epidemiology of lymphomas. **Histopathology** 2011; 58:4-14.

Rummel M. Reassessing the standard of care in indolent lymphomas: a clinical update to improve clinical practice. **J Natl Compr Canc Netw** 2010; 8 Suppl 6:S1-14; quiz S15.

Saha A, Robertson ES. Epstein barr virus associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. **Clin Cancer Res** 2011; 17:3056-63.

Salles GA. Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2007:216-25.

Sandlund JT. Should adolescents with NHL be treated as old children or young adults? **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2007:297-303.

Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Working Group. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. **Blood** 2010; 116:3724-34.

Sarid R, Sato T, Bohenzky J, Russo JJ, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. **Nat Med** 1997; 3:293-8.

Sarid R, Wiezorek JS, Moore PS, Chang Y. Characterization and cell cycle regulation of the major Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8) latent genes and their promoter. **J Virol** 1999; 73:1438-46.

Sebatier J, Uro-Coste E, Benouaich A, et al. Immunodetection of SV40 large T antigen in human central nervous system tumours. **J Clin Pathol** 2005; 58:429-31.

Shah KV, Ozer HL, Pond HS, Palma LD, Murphy GP. SV40 neutralizing antibodies in sera of US residents without history of polio-immunization. **Nature** 1971; 231:448-9.

Shah MH, Porcu P, Mallery SR, Caligiuri MA. AIDS-associated malignancies. **Cancer Chemother Biol Response Modif** 2003; 21:717-46.

Shah KV. SV40 and human cancer: A review of recent data. **Int J Cancer** 2007; 120:215-23.

Shimoyama Y, Asano N, Kojima M, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders: Diagnostic approach to a newly recognized clinicopathological entity. **Pathol Int** 2009; 59:835-43.

Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J et al. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. **Blood** 1991; 77:1516 –26.

Shivapurkar N, Harada K, Reddy J, et al. Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas. **Lancet** 2002; 359:851-2.

Sjöberg J, Halthur C, Kristinsson SY, et al. Progress in Hodgkin lymphoma: A population-based study on patients diagnosed in Sweden 1973-2009. **Blood** 2012; 119:990-6.

Soares A, Biasoli I, Scheliga A, et al. Socioeconomic inequality and short-term outcome in Hodgkin's lymphoma **Int J Cancer** 2006; 120:875-9.

Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, et al. Kaposi's sarcoma –associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease. **Blood** 1995; 86:1276-80.

Souza EM, Baiocchi OC, Zanichelli MA, Alves AC, Oliveira JS. Comparison between hybrid MOPPABV and ABVD chemotherapy protocols for Hodgkin's lymphoma in public hospitals of the largest South American city: a retrospective 14-year study. **Ann Hematol** 2009; 88:633-7.

Souza EM, Baiocchi OCG, Zanichelli MA, et al. Impact of Epstein Barr virus in the clinical evolution of patients with classical Hodgkin's lymphoma in Brazil. **Hematol Oncol** 2010; 28:137-41.

Spear PG, Longnecker R. Herpesvirus entry: an update. **J Virol** 2003; 77:10179-85.

Strickler HD, Goedert JJ, Devesa SS, Lahey J, Fraumeni-Jr JF, Rosenberg PS. Trends in U.S. Pleural Mesothelioma Incidence Rates Following Simian Virus 40 Contamination of Early Poliovirus Vaccines. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:38-45.

Tan LH. A practical approach to the understanding and diagnosis of lymphoma: an assessment of the WHO classification based on immunoarchitecture and immune-ontogenic principles. **Pathology** 2009; 41:305-26.

Tan CS, Ellis LC, Wüthrich C, et al. JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. **J Virol** 2010; 84:9200-9.

Taylor GS, Blackbour DJ. Infectious agents in human cancers: lessons in immunity and immunomodulation from gammaherpesviruses EBV and KSHV. **Cancer Lett** 2011; 305:263-78.

Tedeschi R, Caggiari L, Silins I, et al. Seropositivity to human herpesvirus 8 in relation to sexual history and risk of sexually transmitted infections. **Int J Cancer** 2000; 87:232-5.

Toracchio S, Kozinetz CA, Killen DE, et al. Variable frequency of polyomavirus SV40 and herpesvirus EBV in lymphomas from two different urban population groups in Houston, TX. **J Clin Virol** 2009; 46:154-60.

Tumwine LK, Orem J, Kerchan P, Byarugaba W, Pileri SA. EBV, HHV8 and HIV B cell non Hodgkin lymphoma in Kampala, Uganda. **Infect Agent Cancer** 2010; 5:12.

Ulrickson M, Press OW, Casper C. Epidemiology, diagnosis, and treatment of HIV-Associated non Hodgkin lymphoma in resource limited settings. **Adv Hematol** 2012; 2012:932658.

Uner A, Akyurek N, Sagalm A, et al. The presence of Epstein barr vírus (EBV) in diffuse large B cell lymphomas (DLBCLs) in Turkey: special emphasis on EBV-positive DLBCL of the elderly. **APMIS** 2011; 119:309-16.

Van Oers MHJ, Van Glabbeke M, Teodorovic I, et al. Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab;MabThera) in remission induction and maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin's lymphoma: final analysis of a phase III randomized intergroup clinical trial. **Blood** 2005; 106:107a.

Vassallo J, Andrade LA, Pedro RJ, Aranha FJ. Peripheral T-cell lymphoma in HIV-positive patients. **Rev Paul Med** 1993; 111:427-9.

Vassallo J. **Expressão de EBV e de proteínas relacionadas à apoptose em linfomas de Hodgkin clássicos do adulto**. Campinas(SP); 2001. [Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp].

Vassallo J, Metze K, Traina F, Souza CA, Lorand-Metze I. Expression of Epstein barr vírus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients. **Haematologica** 2001; 86:1227-8.

Vassallo J, Rebouças I, Brousset P. Detection of HHV-8 in reactive lymphoid tissue of patients from São Paulo state, Brazil. **J Clin Pathol** 2002; 55:78-9.

Vassallo J, Metze K, Traina F, de Souza CA, Lorand-Metze I. The relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma** 2003; 44:483-8.

Vassallo J, Paes RP, Soares FA, et al. Histological classification of 1,025 cases of Hodgkin's lymphoma from the State of São Paulo, Brazil. **São Paulo Med J** 2005; 123:134-6.

Vilchez RA, Butel JS. SV40 in human brain cancers and non-Hodgkin's lymphoma. **Oncogene** 2003; 22:5164-72.

Vilchez RA, Butel JS. Emergent human pathogen simian virus 40 and its role in cancer. **Clinical Microbiol Review** 2004; 17:495-508.

Vilchez RA, Lopez-Terrada D, Middelton JR, et al. Simian virus 40 tumor antigen expression and immunophenotypic profile of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. **Virology** 2005; 342:38-46.

Vilchez RA, Jauregui MP, Hsi ED, Novoa-Takara L, Chang CC. Simian virus 40 in post transplant lymphoproliferative disorders. **Hum Pathol** 2006; 37:1130-6.

Viscidi RP, Rollison DE, Viscidi E, et al. Serological cross reactivities between antibodies to simian virus 40, BK virus and JC virus assessed by virus-like particle based enzyme immunoassays. **Clin Diagn Lab Immunol** 2003; 10:278-85.

Vockerodt M, Morgan SL, Kuo M, et al. The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. **J Pathol** 2008; 216:83-92.

Von Wasielewski S, Franklin J, Fischer R, et al. Nodular sclerosing Hodgkin disease: a new grading predicts prognosis in intermediate and advanced stages. **Blood** 2003; 101:4063-9.

Wada N, Junichiro I, Hori Y, et al. Epstein barr vírus in diffuse large B cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in western countries. **J Med Virol** 2011; 83:317-21.

Weiss LM, Jaffe ES, Liu XF, Chen YY, Shibata D, Medeiros LJ Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in agioimmunoblastic, lymphadenopathy and andioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. **Blood** 1992; 79:1789-95.

Wood C, Harrington WJ. AIDS and associated malignances. **Cell Res** 2005; 15:947-52.

Wüthrich C, Kesari S, Kim WK, et al. Characterization of lymphocytic infiltrates in progressive multifocal leukoencephalopathy: co-localization of CD8(+)Tcells with JCV-infected glial cells. **J Neurovirol** 2006;12:116-28.

Yahalom J. Does radiotherapy still have a place in Hodgkin lymphoma? **Curr Hematol Malig Rep** 2009, 4:117-24.

Zerbini MCN, Soares FA, Morais JCM, et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfoides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. **J Bras Patol Med Lab** 2011; 47:643-48.

Zhang L, Qi F, Gaudino G, et al. Tissue tropism of SV40 transformation of human cells: role of the viral regulatory region and of cellular oncogenes. **Genes Cancer** 2010; 1:1008-20.

Zhong W, Wang H, Herndier B, Ganem D. Restricted expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:6641-6.

Anexo 1 - Identificação dos colaboradores do projeto.

IDENTIFICAÇÃO DOS COLABORADORES DO PROJETO

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares. Pesquisador 1-C do CNPq; médico anatomopatologista, Professor Titular de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo de São Paulo; Professor do curso de pós-graduação em Oncologia do Centro de Ensino e Pesquisa da Fundação Antonio Prudente, Professor-visitante do curso de pós-graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini. Professora Assistente Doutora do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, vinculada ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Dr. Roberto Pinto Paes. Professor Assistente Doutor do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e vinculado ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital da mesma entidade.

Dr. Cristovam Scapulatempo Neto. Médico Patologista e pesquisador vinculado ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de Barretos, São Paulo.

Características dos Serviços Hospitalares Colaboradores com o Projeto

O Hospital AC Camargo, sede da pesquisa, foi inaugurado em 1953 na cidade de São Paulo, com uma trajetória longa como um centro de diagnóstico e tratamento oncológico, sendo uma referência internacional em pesquisa multidisciplinar. Mais de 400 médicos especializados atuam em 44 especialidades diferentes que tratam mais de 800 tipos de câncer. Um completo centro de tratamento oncológico com 60 mil m² contemplando 321 leitos, Ambulatórios de Atendimento, Área de Diagnóstico, UTI, Centro Cirúrgico, Anatomia Patológica, Quimioterapia e Radioterapia. Média anual de 14 mil cirurgias, 40 mil sessões de quimioterapia, mais de 50 mil aplicações de radioterapia, 200 mil exames de diagnóstico de imagem, 300 mil atendimentos ambulatoriais e mais de 13 mil internações. Ao todo, o A.C. Camargo dispõe de 321 leitos e até o final de 2011 totalizou 441 leitos, configuração comparável a do MD Anderson Cancer Center, nos EUA, principal Centro Oncológico Mundial e um dos parceiros internacionais do A.C. Camargo. Reúne uma casuística de mais de 350 mil pacientes atendidos em quase seis décadas. Trata-se de uma instituição de direito privado, que atende cerca de 60% de pacientes particulares e conveniados e 40% do sistema único de saúde (SUS).

Hospital de Câncer de Barretos, situado na cidade de Barretos no interior paulista, tem como objetivo de tratar paciente de câncer, sem nenhum recurso financeiro (SUS). Em 1967 foi instituída a Fundação Pio XII e, em 1968, passou a atender pacientes portadores de câncer. No ano de 1989, Henrique Prata, filho do casal de médicos fundadores do hospital, abraça a idéia do pai e com a ajuda de fazendeiros da cidade e da região realiza mais uma parte do projeto. O pavilhão Antenor Duarte Villela, onde funciona o ambulatório do novo hospital é inaugurado em 6 de dezembro de 1991 e, além do auxílio financeiro governamental, recebem apoio de iniciativa privada e artistas. O Instituto de Prevenção conta com equipamentos de última geração, consultórios e equipe altamente

qualificada, além das Unidades Móveis de Prevenção que realizam exames preventivos na população carente de diversas cidades do país. O atendimento diário é de cerca de 3.000 pacientes, 100% SUS e procedentes de 1342 municípios em 27 estados brasileiros. Possui 1800 colaboradores e 200 médicos com dedicação exclusiva. O Instituto de Ensino e Pesquisa conta com laboratórios de biologia molecular, telemedicina realizando videoconferências com instituição de todo o mundo.

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo é uma autarquia do Governo do Estado de São Paulo, vinculada à Secretaria de Estado da Saúde, para fins de coordenação administrativa e associada à Faculdade de Medicina da USP para fins de ensino, pesquisa e prestação de ações e serviços de saúde destinados à comunidade através do SUS. Na área assistencial, atua por meio de ações de promoção da saúde, prevenção das doenças, atenção médico-hospitalar no nível terciário de complexidade e reabilitação de sequelas após o tratamento das doenças. Na área acadêmica, desenvolve cursos de graduação e pós-graduação *senso lato* e *senso estrito*. Na área de pesquisa, atua em todos os ramos das ciências da saúde, por meio de seus 62 Laboratórios de Investigação Médica. Inaugurado em 1994 na cidade de São Paulo, o complexo Hospitalar das Clínicas de FMUSP é considerado um dos mais importantes pólos brasileiros de disseminação de informações técnico-científicas, sendo um Centro de excelência e referência no campo de ensino, pesquisa e assistência. Com área construída em 378.545,32 m² conta com 2.000 leitos e 15 mil profissionais nas mais diversas profissões. É formado por 7 Institutos, 2 Hospitais Auxiliares, Laboratórios de Investigação Médica, unidades especializadas e demais áreas de apoio como o Prédio da Administração e Anexos, o Centro de Convenções Rebouças e a Escola de Educação Permanente.

Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas, localizado dentro do campus da Universidade Estadual de Campinas, é um dos hospitais do complexo hospitalar ligado à Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, sendo considerado um centro de referência em diversas

especialidades médicas, possuindo excelência reconhecida nacionalmente. A história do HC está intimamente ligada à Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, autorizada a funcionar em 1963. Provisoriamente, permaneceu instalada nas dependências da Maternidade de Campinas até 1966. Atualmente, o HC conta com uma área construída de 65.000,00 m². São mais de 4.000 m² em corredores distribuídos em sete blocos interligados por onde circulam mais de 10.000 pessoas diariamente. Juntamente com os demais hospitais, o Complexo hospitalar da FCM-UNICAMP soma mais de 820 leitos, 100% SUS, um dos maiores complexos hospitalares do país. Esse hospital tem como objetivo a promoção do ensino e da pesquisa, atuando como suporte no ensino e treinamento a residentes e estudantes dos cursos de graduação e pós-graduação de medicina e enfermagem da própria Unicamp e de outras instituições conveniadas. Como características da infraestrutura destaca-se a capacidade ocupacional de 403 leitos, centros de cirurgia geral, ambulatorial, emergência e unidades de terapia intensiva para adultos, pediátrica e transplantes de órgãos e coronariana. O Hospital de Clínicas da Unicamp tem como objetivo a promoção do ensino, da pesquisa e da assistência servindo de campo de ensino e treinamento a residentes e estudantes dos cursos de graduação e pós-graduação de medicina e enfermagem da FCM/UNICAMP e de outras instituições. A atuação de docentes altamente qualificados possibilita que sejam realizadas assistências em diversas especialidades médicas ambulatoriais, que se dividem em cerca 580 sub-especialidades.

Hospital da Irmandade Santa Casa Misericórdia de São Paulo. A Ordem das Santas Casas de Misericórdia foi instituída em Portugal, no ano de 1498, pela Igreja Católica, tendo como objetivo principal a prática de obras de caridade. A Santa Casa de Misericórdia de São Paulo é a mais antiga instituição assistencial e hospitalar em funcionamento na cidade de São Paulo, preferencialmente a pacientes previdenciários, situada no distrito da Consolação na capital paulista. Há registros de que funcionou como um centro de formação de médicos e cirurgiões por séculos, como hospital-escola de outros institutos de ensino. A Faculdade de Ciências Médicas da

Santa Casa de São Paulo iniciou suas atividades acadêmicas em 1963. A missão da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo é promover ensino, pesquisa, extensão e atenção à saúde em níveis de excelência. A Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo está inserida no Complexo Hospitalar da Irmandade de Misericórdia da Santa Casa de São Paulo. Por isso desenvolve as atividades da graduação e pós-graduação nas seguintes áreas do Hospital Central (770 leitos, 50 salas cirúrgicas, 5 subdivisões de emergência - Pediatria, Cirurgia, Clínica Médica, Obstetrícia e Ginecologia, Ortopedia e Traumatologia), Unidades de Tratamento Intensivo e toda a infraestrutura de suporte diagnóstico e procedimentos. Executa todos os tipos de atendimentos, incluindo-se transplantes de órgãos. O Hospital São Luís Gonzaga destina-se a atendimento a nível de referência secundária (225 leitos, 13 salas de cirurgia, Pronto Socorro Geral, laboratório de Patologia Clínica e Radiologia convencional). O Hospital Geriátrico D. Pedro II mantém 710 leitos, utilizando-se dos serviços médicos dos outros dois Hospitais, quando necessário.

São Paulo, 24 de Outubro de 2008.

Ao
Dr. José Vassallo

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1120/08
"Detecção Retrospectiva de vírus oncogênicos (EBV, HHV8 e SV40) em tecidos parafinados de linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antônio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 14/10/2008, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de compromisso do pesquisador com resoluções do CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1120/08

Título: "Detecção retrospectiva de vírus oncogênicos (EBV, HHV8 E SV40) em tecidos parafinados de linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos".

Pesquisador Responsável: Dr. José Vassallo

Aluna: Adriana Helena Moreira (Douforado)

Comentários gerais:

Trata-se de projeto de pesquisa de caráter retrospectivo, com a finalidade de estudar a associação de infecção viral (EBV, HHV8, SV40) em linfomas diagnosticados nesta Instituição, utilizando-se os métodos de imunistoquímica e hibridização "in situ" em material de arquivo emblocado em parafina.

Adequação do título: adequado para a finalidade do projeto.

Adequação da revisão de literatura: adequada para a finalidade do projeto.

Adequação dos objetivos frente à literatura: adequados.

Desenho e metodologia do projeto (grupos experimentais, procedimentos, indicadores de resultado, tipo de estudo, fase da pesquisa):

Adequados.

Crêterios de inclusão: adequados.

Crêterios de exclusão: adequados.

Riscos e benefcios aos sujeitos: não há.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Dispensável, por se tratar de pesquisa retrospectiva envolvendo blocos de parafina dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica. A busca de dados nos prontuários não comprometerá a privacidade dos pacientes cujo material tenha sido selecionado para o estudo.

Análise crítica de riscos: não há riscos para os sujeitos cujos blocos de parafina serão selecionados para o estudo.

Duração total da pesquisa: prevista para 30 meses.

Explicitação das responsabilidades:

- **do pesquisador:** adequada.
- **do patrocinador:** não se aplica.

Explicitação dos critérios para suspender ou encerrar a pesquisa: não se aplica.

Local de pesquisa: Departamento de Anatomia Patológica – Hospital A.C. Camargo – Fundação Antônio Prudente.

Fonte financeira: a ser solicitada (FAPESP).

Análise da Comissão de Ensino e Pesquisa – CENP: Aprovado

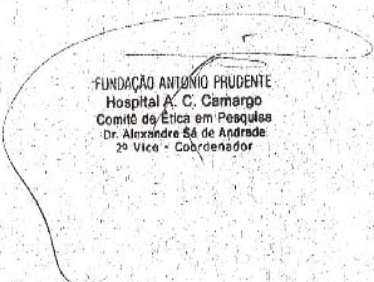
Não ficou claro se a metodologia de hibridização in situ está padronizada e implementada na instituição e sobre a viabilidade da detecção dos RNAs mencionados por esta metodologia nas amostras parafinadas a serem empregadas

Comentários Finais:

Projeto de importância para o estudo da relação entre infecção viral e patogênese de Linfomas em nosso meio, com boa probabilidade de sucesso, a depender da casuística.

Parecer Final:

Aprovado com sugestões.



FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisas
Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice - Coordenador

Título do Projeto de Pesquisa

DETECÇÃO RETROSPECTIVA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS (EBV, HHV8 E SV40) EM TECIDOS PARAFINADOS DE LINFOMAS HUMANOS E CORRELAÇÃO COM DADOS CLINICOPATOLÓGICOS.

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	01/10/2008 08:30:58	27/10/2008 10:56:48		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	25/09/2008 09:27:40	Folha de Rosto	FR221249	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	01/10/2008 08:30:58	Folha de Rosto	0088.0.022.000-08	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	27/10/2008 10:56:48	Folha de Rosto	1120/08	CEP

Título do Projeto de Pesquisa

DETECÇÃO RETROSPECTIVA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS (EBV, HHV8 E SV40) EM TECIDOS PARAFINADOS DE LINFOMAS HUMANOS E CORRELAÇÃO COM DADOS CLINICOPATOLÓGICOS.

Número Folha de Rosto.	Nome do CEP Responsavel
221249	Fundação Antonio Prudente - Hospital AC Camargo - SP



CEP, 08/09/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 688/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0550.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “REGISTRO DE LINFOMAS MALIGNOS DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP. BASE PARA A PESQUISA DE VÍRUS LIGADOS À LINFOMAGÊNESE”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Vassalo.

INSTITUIÇÃO: Depto. de Anatomia Patológica/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/08/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 08/09/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Formar um registro de linfomas malignos diagnosticados e tratados na FCM-UNICAMP. Estudar a freqüência com que os vírus oncogênicos EBV, HHV8, SV40 podem ser detectados em tecidos parafinados de linfomas humanos, utilizando técnicas de imunistoquímica e hibridização *in situ*. Avaliar a presença de vírus em relação a faixa idade, gênero, local de procedência do paciente, presença de imunossupressão. Avaliar a presença de vírus em relação aos critérios de grau histológico e histogênese.

III - SUMÁRIO

Projeto de pesquisa. Estudo retrospectivo, incluindo informações do prontuário do paciente e tecidos incluídos em parafina, previamente retirados do paciente no momento do diagnóstico, obtidos nos arquivos de patologia (tamanho da amostra 300-500 pacientes). Critérios de inclusão: pacientes com diagnóstico de linfoma maligno (entre 1990 e 2009), na FCM-UNICAMP. Critérios de exclusão: pacientes cujos prontuários não possuem as informações necessárias, casos em que os blocos de parafina com material biológico não sejam suficientes para as análises propostas.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Conforme solicitado pelo pesquisador, este Comitê de Ética em Pesquisa aprova a pesquisa em sua etapa de registro. Por se tratar de estudo multicêntrico nacional, este Comitê será considerado o primeiro centro e a aprovação nos demais centros participantes se faz necessária por submissão aos Comitês locais.

V - PARECER DO CEP



O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na VII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de julho de 2009.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner

PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM/UNICAMP



FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS				FR - 243438	
Projeto de Pesquisa Detecção retrospectiva de vírus oncogênicos (EBV, HHV8, E SV40) em tecidos parafinados de linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos.					
Área de Conhecimento 4.00 - Ciências da Saúde - 4.01 - Medicina - Epide.				Grupo Grupo III	Nível Epidemiológico
Área(s) Temática(s) Especial(s)				Fase Não se Aplica	
Unitermos Oncovírus, linfomas					
Sujeitos na Pesquisa					
Nº de Sujeitos no Centro 200	Total Brasil 200	Nº de Sujeitos Total 200	Grupos Especiais Criança e ou menores de 18 anos.		
Placebo NAO	Medicamentos HIV / AIDS NÃO	Wash-out NÃO	Sem Tratamento Específico NÃO	Banco de Materiais Biológicos SIM	
Pesquisador Responsável					
Pesquisador Responsável Cristovam Scapulatempo Neto			CPF 638.996.801-97	Identidade 681846 SSP/MS	
Área de Especialização MEDICINA			Maior Titulação DOUTORADO	Nacionalidade BRASILEIRO	
Endereço ALAMEDA PANAMÁ, 75			Bairro CITY BARRETOS	Cidade BARRETOS - SP	
Código Postal 14784-006	Telefone 17-33216600 R6856 / 17-33254996		Fax 17-33216629	Email cristovamscapula@uol.com.br	
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não.					
Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.					
Data: <u>16 / 02 / 2009</u>			Assinatura <u>Cristovam Scapulatempo Neto</u>		
Instituição Onde Será Realizado					
Nome Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos		CNPJ 49.150.352/0001-12	Nacional/Internacional Nacional		
Unidade/Órgão Anatomia Patológica		Participação Estrangeira NÃO	Projeto Multicêntrico NÃO		
Endereço Rua Antenor Duarte Villela nº1331		Bairro Dr Paulo Prata	Cidade Barretos - SP		
Código Postal 14787400	Telefone 17 33216600	Fax 1733216600	Email cep@hcancelbarretos.com.br		
Termo de Compromisso					
Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.					
Nome: <u>Antonio Salvo Jose de Oliveira</u>			Assinatura <u>Ant</u>		
Data: <u>26 / 02 / 09</u>					

O Projeto deverá ser entregue no CEP em até 30 dias a partir de 16/02/2009. Não ocorrendo a entrega nesse prazo esta Folha de Rosto será INVALIDADA.



Comitê de Ética em Pesquisa CEP

Para: Cristovam Scapulatempo Neto

De: Renato José Affonso Junior
Coordenador do CEP

Data: 03/04/2009

Projeto de Pesquisa: 201/2009

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou as pendências estipuladas em reunião ocorrida na data de 12/03/2009, referente ao projeto “*Deteção retrospectiva de vírus oncogênicos (EBV, HHV8, E SV40) em tecidos parafinados de linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos*”, decidindo pela aprovação do mesmo.

Atenciosamente,

Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DIVISÃO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

São Paulo, 24 de março de 2.009

À

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPESQ

Prezados Senhores,

Informamos que o Projeto intitulado: "DETECÇÃO RETROSPECTIVA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS (EBV, HHV8 E SV40) EM TECIDOS PARAFINADOS DE LINFOMAS HUMANOS E CORRELAÇÃO COM DADOS CLINICOPATOLÓGICOS", sob a coordenação do Prof. Dr. José Vassallo, foi aceito para ser desenvolvido em conjunto com a Divisão de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Informamos também que a patologista Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini ficará responsável pelas tarefas a serem desenvolvidas nesta Divisão.

Atenciosamente,

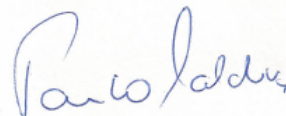
Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves
Diretor
Divisão de Anatomia Patológica

*Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – PAMB - 10º andar – Anatomia Patológica - CEP 05403-000
tels.: 3069-6091 / 6092 / 6281 / 7996 – fax: 3069-7997 – e-mail.: secretaria.dap@hcnet.usp.br*



FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: DETECÇÃO RETROSPECTIVA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS (EBV, HHV8 E SV40) EM TECIDOS PARAFINADOS DE LINFOMAS HUMANOS E CORRELAÇÃO COM DADOS CLINICOPATOLÓGICOS		2. CAAE:	
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Mária Claudia Nogueira Zerbini			
6. CPF: 029.386.598-14		7. Endereço (Rua, n.º): ESTELA SEZEFREDA PINHEIROS 59 SAO PAULO SAO PAULO 05415070	
8. Nacionalidade: BRASILEIRA		9. Telefone: (11) 3088-6160	10. Outro Telefone:
		11. Email: czerbini@usp.br	
12. Cargo:			
Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Terho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.			
Data: 28, 06, 2012		 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP		14. CNPJ: 60.448.040/0001-22	15. Unidade/Órgão:
16. Telefone: (11) 3069-6442		17. Outro Telefone:	
Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.			
Responsável: ELOÍSA SILVA DUTRA DE OLIVEIRA BONFÁ		CPF: 042.658.928-92	
Cargo/Função: Diretora Clínica do HCFMUSP			
Data: 11, 07, 12		 Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL		PROFESSORA ELOÍSA BONFÁ Diretora Clínica do HCFMUSP	
Não se aplica.			

Prof. Dr. Paulo H. N. Saldiva
Chefe do Depto. de Patologia



Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
U.E.S. de Anatomia Patológica
C.C. 010061001

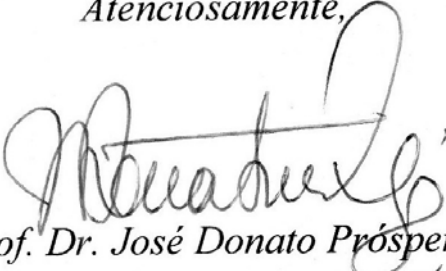
São Paulo, 23 de setembro de 2009.

À
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPESQ

Prezados Senhores,

Informamos que o Projeto intitulado: “DETECÇÃO RETROSPECTIVA DE VÍRUS ONCOGÊNICOS (EBV, HHV8 E SV40) EM TECIDOS PARAFINADOS DE LINFOMAS HUMANOS E CORRELAÇÃO COM DADOS CLINICOPATOLÓGICOS”, sob a coordenação do Prof. Dr. José Vassallo, foi aceito para ser desenvolvido em conjunto com o Serviço de Anatomia Patológica da ISCMSP. Informamos também que o patologista Prof. Dr. Roberto Antonio Pinto Paes ficará responsável pelas tarefas a serem desenvolvidas neste Serviço.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Donato Próspero

Anexo 2 - Protocolo de reação imunoistoquímica e hibridização in situ para detecção de oncovírus EBV, HHV8 e SV40.

A) REAÇÃO DE IMUNOISTOQUÍMICA:pH 9.0

Procedimentos:

- 1 O bloco de *Tissue Microarray* (TMA) é cortado no micrótomo rotativo na espessura de 5 µm. Coloca-se adesivo (tape) contra o bloco de TMA em fase antecedente ao corte. As lâminas sofrem banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em freezer.
- 2 Desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa 60°C, e em seguida:
 - 3.1 Xilol a 60°C por 20 minutos
 - 3.2 Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos
 - 3.3 Etanol 100% 30 segundos
 - 3.4 Etanol 85% 30 segundos
 - 3.5 Etanol 70% 30 segundos
- 4 Lavar as lâminas em água corrente e destilada.
- 5 Ferver a solução tampão Tris EDTA 1 mM pH 9.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.
- 6 Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Cronometrar 4 minutos após esse sinal.
- 7 Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total.
- 8 Destampar a panela com as lâminas e lavar em água corrente e destilada.
- 9 Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ [3%], (água oxigenada 10 vol), 3X (10 min).
- 10 Lavar em água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-*phosphate buffered saline*) 10mM pH 7.4 (5 min).
- 11 Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme tabela abaixo, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 30 min (37°C) ou 18 h (4°C) em câmara úmida.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
SV40-Tag	MRQ-4	1:100	Cell Marque cat# 351M-16 , Rocklin, CA, EUA
HHV8-LNA-1	13B10/LN35	1:100	BioSB cat# BSB 5650, Santa Bárbara, CA, EUA

- 12 Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- 13 Incubar por 30 min a 37° C com Advance™ HRP Link (Dako cod# K4068, Carpinteria, CA, EUA).
- 14 Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
- 15 Incubar com o Advance™ HRP Enzyme por 30 min a 37° C (sistema de polímero/amplificação Dako), em câmara úmida.
- 16 Lavar em tampão PBS (3X), por 3 minutos cada.
- 17 Incubar as lâminas em solução substrato: 100 mg de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. **Esta etapa pode ser substituída pelo uso de solução DAB/Dako (1:50 = DAB:Diluyente, utilizando-se 100ul/TMA).**
- 18 Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.
- 19 Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.
- 20 Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
- 21 Lavar bem em água corrente e destilada
- 22 Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.
- 23 Desidratar as lâminas em:
 - 23.1 Etanol 80%, 30 segundos
 - 23.2 Etanol 95%, 30 segundos
 - 23.3 Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada
 - 23.4 Xilol 4 vezes, 30 segundos cada
- 24 Montagem das lâminas em *Entellan neu* (Merck, 1.07961, Alemanha)

B) REAÇÃO IMUNOISTOQUIMICA pH 6.0

Todas as etapas descritas para a detecção dos oncovirus HHV8 e SV40 são aplicadas para o EBV, **substituindo-se apenas o item 5 (recuperação antigênica), com solução tampão citrato 10 mM pH 6.0. Como anticorpo primário foi utilizado:**

Anticorpo	Clones	Títulos	Fabricantes
EBV-LMP1	CS1-4	1:200	Dako, cod M0897, Glostrup, Dinamarca

(*) Modificações do protocolo do fabricante sugeridas pela técnica de laboratório Suely Nonogaki e padronização da técnica no laboratório de pesquisa, CIPE-HACC.

C) REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA DETECÇÃO DE HERPESVÍRUS EBV, HHV8

Procedimentos:

- 1 Utilizar cortes de lâminas de blocos de *Tissue Microarray* (TMA) com ausência de adesivo (tape), com 5 µm de espessura.
- 2 As lâminas de TMA e controles são armazenadas no freezer até o momento de seu uso.
- 3 Desparafinizar as lâminas em estufa por 15 minutos em estufa 60° C e, em seguida:
 - 3.1 Xilol 10 min (3X)
 - 3.2 Álcool 100% 5 min (3X)
 - 3.3 Lavar em água corrente 5min
- 4 Bloquear reação com peroxidase 10V (H₂O₂)
- 5 Tirar o excesso de H₂O₂ com água destilada por 5 min
- 6 Escorrer excesso em papel filtro
- 7 Incubar 100ul de Proteinase K por 10 min à 37° C (hibridizador), cobrindo com lamínula e selar. As alíquotas de proteinase K são armazenadas em freezer, solução estoque (9 ul) e no momento do uso, diluir em Tris-Hcl 50mM pH 7.6
- 8 Lavar em água corrente 3 min e desidratar em alcoóis:
 - 8.1 70%, 2 min
 - 8.2 85%, 2 min
 - 8.3 100%, 2 min
- 9 Secar à RT (Temperatura ambiente)
- 10 Adicionar sondas:

Sondas	Títulos	Fabricantes
EBV-EBER	20ul	Novocastra Laboratories, Newcastle, Reino Unido
HHV8-T1.1	20ul	Novocastra Laboratories, Newcastle, Reino Unido

(*) pode ocorrer a variação de titulação devido a quantidade de amostras/TMA

- 11 As sondas permanecem por 18-24HS, hibridizador 37° C. Lâminas cobertas com lamínulas e seladas. Para EBER a eficiência da sonda pode ocorrer em 3Hs e dar o procedimento de rotina no dia.
- 12 Retirar lamínula adesivada com cuidado e lavar com PBS à RT por 3min (1X)
- 13 Lavar com solução TBS pH7.6 e Triton X-100 (0.1%), por 3min (3X) Solução estoque à RT.
- 14 Incubar com solução bloqueadora (SB=400ul+SC=100ul), 10min (1X):

- SB (1:1) = 500 ul de TBS pH7.6 e Triton X-100 (0.1%) + 500ul BSA 6%
 - SC= Soro normal de coelho
 - BSA, solução estoque congelada 6%
- 15 Retirar lamínula, escorrer excesso da solução em papel filtro.
 - 16 Adicionar conjugado (kit-Dako, frasco A, com anti- FITC) diluído 1:100 em solução de TBS+Triton (500ul) + BSA 6% (500ul)
 - 17 Hibridizar por 30min, 37° C (com laminula)
 - 18 Lavar em TBS pH 7.6, 3min (2X)
 - 19 Lavar em tampão ALP pH9.0 (RT), 5min no escuro
 - ALP= Tris Hcl 100mM, MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM em 1L/Água MQ
 - 20 Escorrer e adicionar substrato enzimático do Kit-Dako frasco B (enzima/substrato) e C (levamisole), diluído em ALP (10ul B+0,5ulC+500ul ALP) por 1hora, 37° C
 - 21 Lavar em água corrente, por 5 min.
 - 22 Contracoloração com Hematoxilina
 - 23 Secar à RT
 - 24 Montar lâminas em meio aquoso e selar (armazenar no escuro).

(*) Modificações do protocolo do fabricante sugeridas pelo técnico de laboratório José Ivanildo Neves.

D) REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA DETECÇÃO DE POLIOMAVÍRUS SV40, JCV e BKV

Sondas provenientes do fornecedor **Enzo Life Sciences (Science PRO)**, como segue:

Poliomavírus	Código	Descrição
BKV	40848	BK Virus BioProbe® 2g
JCV	40847	JC Virus BioProbe® 2g
SV40	40845	SV40 BioProbe® 2g

Resumidamente, o fabricante sugere a utilização dos reagentes do Kit **Ultrasensitive® Enhanced Horseradish Peroxidase-AEC in situ detection system:**

- A) Pós-hibridização, 15ml (identificado/frasco branco): tampão formamide. Estoque à 2-8° C, pós uso.
- B) Bloqueio/Tampão/Anticorpo, 15ml (identificado/frasco verde): tampão fosfato salino contendo proteína bloqueadora. Estoque à 2-8° C, pós uso.

- C)** Anti-Biotina/Coelho, 15 mL (frasco/Pink). Anti-biotina de coelho em tampão fosfato salino. Estoque à 2-8° C, pós uso.
- D)** Biotina anti-cabra-coelho IgG (frasco purple) 15mL.
- E)** Reagente de detecção, 15 mL (frasco amarelo). Streptavidina-biotinilada, complexo peroxidase em tampão fosfato salino. Estoque à 2-8° C, pós uso.
- F)** Reagente AEC, 1mL (vermelho). Aminoetilcarbazole em dimethylformamide. Estoque à 20° C pós uso.
- G)** Tampão para reação/Reagente-substrato, 3 X 6mL (cinza). Peróxido de hidrogênio em tampão acetato. Estoque à 2-8° C, pós uso.
- H)** Corante Azul, 15mL. Usado em solução aquosa/hematoxilina. Estoque RT/escuro.
- I)** Tampão de lavagem/salina-Enzo (para 4 L). Tampão fosfato salino pH7.1. Estoque à 2-8° C, pós uso.

Procedimento:

- 1** Desparafinizar lâminas de TMA, em cortes de 5um, sem adesivo (tape): 15min à 60°C, e baterias de:
 - Xilol I, 10 min
 - Xilol II, 2 min
 - Álcool 1, 100%, 1min
 - Álcool 2, 100%, 1min
 - Álcool 3, 90%, 1 min
 - Álcool 4, 70%, 1 min
- 2** Lavar em água deionizada, 1 min.
- 3** Bloquear reação com peroxidase 10V (H₂O₂)
- 4** Tirar o excesso de H₂O₂ com água destilada por 5 min
- 5** Escorrer excesso em papel filtro
- 6** Incubar com proteinase K (1X, Solução estoque 10X freezer), por 15 min à 37° C.
- 7** Lavar em água corrente 3 min e desidratar em alcoóis:
 - 70%, 2 min
 - 85%, 2 min
 - 100%, 2 min
- 8** Secar à RT (Temperatura ambiente)
- 9** Adicionar sondas (20ul) e cobrir com lamínula e deixar por 10 min desnaturando à 95° C, e *overnight* (37° C), no hibridizador.
- 10** No dia seguinte, remover lamínula e lavar em solução tampão/Enzo por 5min;

- 11** Adicionar 6-8gotas do reagente (frasco/branco) ou solução pós-hibridização, incubando por 10 min à 37° C;
- 12** Remover solução com tampão-enzó por 2min (2X,) à RT
- 13** Adicionar 6-8 gotas (frasco verde) ou solução bloqueadora por 10 min à 37° C.
- 14** Lavar por 2min (2X) com tampão-Enzo à RT
- 15** Adicionar 6-8 gotas (frasco pink) ou anti-biotina de coelho por 20min à RT
- 16** Lavar em tampão-Enzo por 2min à RT
- 17** Adicionar 6-8gotas (frasco purple) ou anti-cabra-coelho IgG, Enzo, por 20 min à 37° C
- 18** Lavar tampão por 2 min (2X) à RT
- 19** Adicionar 6-8 gotas (frasco amarelo) ou reagente de detecção, por 30 min à 37° C
- 20** Lavar gentilmente com tampão-enzó 10 segundo à RT e incubar por mais 1 min à RT com novo tampão-enzó (2x)
- 21** Adicionar 6-8gotas (frasco/cinza) reagente/substrato, por 20min
- 22** Lavar com tampão Enzo à RT e água destilada rapidamente
- 23** Adicionar 6-8 gotas (frasco azul) ou corante, por 2min à RT no escuro
- 24** Lavar com água destilada 2min e secar à RT
- 25** Montar com meio aquoso e armazenar no escuro.
- 26** Reações positivas de cor vermelho-escuro ou vermelho-queimado (núcleo).

(*) Modificações do protocolo do fabricante sugeridas pelo técnico de laboratório José Ivanildo Neves/Adriana H Moreira.

Anexo 3 - FICHA PACIENTE: dados clinicopatológicos

Projeto: VIRUS ONCOGÊNICOS EM LINFOMAS. Adriana H Moreira/ J Vassallo			
Identificação do Paciente			
Nome:		Data de Nascimento e Idade:	
Gênero	Raça	Número/Registro Hospitalar - Procedência	
AP para TMA:	Data AP para TMA	QDE BL E LAM	Data da Admissão
Origem Paciente	Atual:	Nível:	Profissão
Dados clinicopatológicos :			
(*) N. BLOCO/EMISSÃO:			
Topografia:			
Observações:			
Dados IQ			
Diagnóstico à Admissão:			
Diagnóstico revisto (FINAL):			
Estádio:		IPI:	
Imunodeficiência			
Tratamento NA ADMISSÃO			
Tratamento pós recidiva:			
Remissão completa ; Remissão Clínica, Sem reposta, Resposta Parcial, em: RC= RCL= SR= RP=	Recidiva; Progressão da Doença; Dç em Atividade.:	REC 1=	OBITO:
		REC 2 =	ULT CONS:
		PD/DE=	SED-ULT CONS:

Anexo 3 - FICHA PACIENTE: dados clinicopatológicos

Óbito em:		Última consulta, sem evidência de doença; último retorno; data visto prontuário: SED =
		ULT RET=
		VISTO PRONT =
Resultados das análises para vírus oncogênicos/produtos		
EBV	IQ:	
	HIS-ISH:	
HHV8	IQ:	
	HIS-ISH:	
SV40	IQ:	
	HIS-ISH:	
OBSERVAÇÕES RELEVANTES:		

Apêndice 1 - Painéis imunistoquímicos* aplicáveis em tecidos parafinados para o diagnóstico de linfomas malignos.

* Estes painéis foram utilizados para conclusão diagnóstica no presente estudo.

Quadro 2 - Diagnóstico diferencial das neoplasias indolentes de células linfóides B periféricas

	CD20 ¹	CD3	CD5	CD10	CD23	CicD1	OBSERVAÇÕES
LC/LLC	± ²	-	+	-	+	-	3
LLP	+	-	-	-	-	-	4
LZM	+	-	-	-	-	-	4
LCM	+	-	+	-	-	+	5
LFOL	+	-	-	+	-	-	5
TRIC	+	-	-	-	-	±	6

Legenda: LC/LLC: linfoma linfocítico/ leucemia linfóide crônica; LLP: linfoma linfoplasmocítico; LZM: linfoma da zona marginal; LCM: linfoma de células do manto; LFOL: linfoma folicular; TRIC: tricoleucemia; 1: ou CD79a ou Pax-5; 2: CD20 pode ser positivo focal ou apresentar reatividade fraca; 3: apresenta restrição de cadeia leve intracitoplasmática (kappa ou lambda +), cadeia pesada mais frequentemente expressa é IgM; 4: pode apresentar restrição de cadeia leve intracitoplasmática, no linfoma da zona marginal esplênica cadeia pesada mais frequentemente expressa é IgD; 5: apresenta ainda expressão nuclear da proteína BCL6; 6: apresenta ainda reatividade para CDw76/DBA44 em >95% dos casos. Todos os marcadores mencionados nesta tabela são de reatividade transmembranar, exceto as cadeias de imunoglobulinas que também podem ser citoplasmáticas; ciclina D1 e BCL6 são nucleares.

Quadro 3 - Diagnóstico diferencial das neoplasias hematopóéticas de células blásticas (médias imaturas, com alto índice mitótico)

	CD20	CD79a	Pax-5	CD3	TdT	CicD1	OBSERVAÇÕES
LB-B	+/-	+	+	-	+	-	
LB-T	-	-	-	+	+	-	
LCM-bl	+	+	+	-	-	+	
SGR	-	-	-	-	-/+	-	1
NK-bl	-	-	-	+/-	-	-	2

Legenda: LB-B= neoplasia de células B precursoras/linfoma linfoblástico B; LB-T= neoplasia de células T precursoras/linfoma linfoblástico T; LCM-bl= linfoma de células do manto, forma blastóide; SGR= sarcoma granulocítico; NK-bl= neoplasia de células NK blastóide; +/- pode ser negativo; -/+ pode ser positivo; 1= positivo para marcadores mielóides e/ou monocíticos, como CD68, mieloperoxidase, CD15, CD33, lisozima e também CD45 e CD43 – em se tratando de eritroleucemia, expressão de CD235a (glicoforina A) – em se tratando de leucemia megacarioblástica, expressão de CD61 (gpIIb); 2= raríssimo, positivo para CD56 e negativo para EBV

Quadro 4 - Diagnóstico diferencial entre linfoma de grandes células B (DGCB), linfoma de células B de alto grau (LCBA) e linfoma de Burkitt atípico + linfoma de Burkitt (LBK)

	CD20	CD79a	Pax-5	CD3	CD10	BCL2	BCL6	Ki-67	FISH
LDGCB	+	+	+	-	+ ~30%	+ ~60%	+/-	< 95%	¹
LCBA	+	+	+	-	var	var	var	>95%	²
LBK	+	+	+	-	+ ~85%	-	+	~100%	³

Legenda: var= dados variam na literatura; FISH= hibridização *in situ* fluorescente; 1= translocação IGH-BCL2 presente em ~80-90% dos casos; raramente ocorre a translocação IG-MYC (<5%); a qual pode estar associada a pior prognóstico; 2= translocação IG-MYC está presente em ~40% dos casos e pode haver translocação IGH-BCL2 associada; 3= translocação IG-MYC está caracteristicamente presente e a translocação IGH-BCL2 tipicamente ausente

Quadro 5 - Diagnóstico diferencial entre linfoma de grandes células B rico em linfócitos T/histiócitos (LDGCB-rTH) e linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular (LH-pln)

Marcador	LDGCG-rTH	LH-pln
Pan-B nas células neoplásicas	+	+
BCL2 nas células neoplásicas	Raramente +	+ ~40%
Células neoplásicas envoltas em células reticulares dendríticas¹	+	-
Pan-B nos pequenos linfócitos	+/- ²	- ³
Pan-T nos pequenos linfócitos	-/+	+
Rosetas de linfócitos CD57+	+ 30-40%	Raramente +
CD15	-	-
CD30	-	-
EMA⁴	+	+
EBV	-	-
Pesquisa de rearranjo clonal de IG nas células neoplásicas⁵	+	+

Legenda: IG= imunoglobulinas; +/- predominam os linfócitos B; -/+ linfócitos T são menos frequentes que os B, principalmente entre os nódulos de linfócitos B; 1= este achado independe do fenótipo dos pequenos linfócitos infiltrantes, uma vez que há raros casos de LH-pl com grande número de células T 2= os linfócitos B mantêm a nodularidade, mesmo que focalmente; 3= se houver linfócitos B, estes são esparsos, sem formação de agregados nodulares; 4= ambos com 30-35% de expressão; 5= feita por técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase, PCR, aplicável também em tecidos parafinados.

Quadro 6 - Diagnóstico diferencial entre linfoma de Hodgkin clássico (LHC) e linfoma não-Hodgkin de grandes células anaplásicas T/NULL (LGCA)

Marcador	LHC	LGCA
CD20	- (+ em ~ 10-15%) ¹	-
Pax-5	+ ²	-
Pan T	-	+/- ³
CD15	+ (~ 70-80%)	- (raramente +)
CD30	+	+
EBV	+ (~30-60%) ⁴	-
CD43	Raramente +	Frequentemente +
EMA	Raramente +	Frequentemente +
BNH9	Raramente +	Frequentemente +
Grânulos citotóxicos	-	+
CD246/ALK	-	+ (~60-80%)
Análise molecular	Rearranjo IG	Rearranjo TCR

Legenda: EBV= vírus de Epstein-Barr; EMA= antígeno epitelial de membrana; IG= imunoglobulinas; TCR= receptor de células T; 1= a positividade, quando presente, é heterogênea de célula para célula; 2= a positividade nuclear é mais fraca nas células de Hodgkin-Reed-Sternberg que nos linfócitos B presentes; 3= deve-se utilizar um amplo espectro de marcadores pan-T, pois o CD3 é positivo em apenas 25% dos casos; 4= a frequência da expressão de EBV é maior em países menos desenvolvidos, em indivíduos imunossuprimidos e no tipo celularidade mista.

Quadro 7 - Expressão de marcadores imunistoquímicos em linfomas T/NK

	CD 2	CD 3	CD 4	CD 8	CD 5	CD 7	GRC 1	CD3 0	CD2 5	CD5 6	CG 2	EBV 3
TSO	+	+	+/-	-/+	-/+	-/+	-	-/+	-	-	-	-
E												
T-AI	+	+ ⁴	+	-	+	+	-	-	-	-	+/-	+ ⁵
T-NK	+	+	-	-/+	-	-	+	-	-	+	-	++
ATL	+	+	+	-	+	-	-	-/+	++	-	-	-
ALC	+/-	-/+	+/-	-/+	+/-	-/+	+	++	++	+/-	-	-
L												
T-EN	+	+	-	-/+	-	+	+	-/+	-/+	-/+	-	-
T-HE	+	+	-	+/-	-	+	+/-	-	-	+	-	-
T-SC	+	+	-	+	-/+	+	+	-	-	-	-	-
MF	+	+	+	-/+	+/-	-/+	-	-	-	-	-	-

Legenda: TSOE: linfoma T-periférico sem outra especificação (25% dos linfomas T periféricos); T-AI: linfoma T angioimunoblástico (18%); T-NK: linfoma extranodal T/NK do tipo nasal (10%); ATL: linfoma/leucemia T do adulto, HTLV1+ (9%); ALCL: linfoma de grandes células anaplásicas CD30+, com ou sem expressão de ALK (10%); T-EN: linfoma T enteropático (5%); T-HE: linfoma T hepatoesplênico (1,5%); T-SC: linfoma T subcutâneo (1%); MF: micose fungóide/síndrome de Sézary (corresponde a 40-50% de todos os linfomas T cutâneos); 1: grânulos citotóxicos (perforina, granzima B, TIA-1); 2: marcadores de centros germinativos (CD10 e Bcl6); 3: a pesquisa de EBV deve ser feita por hibridização *in situ* utilizando-se a sonda EBER; 4: neste caso o CD3 tem expressão citoplasmática; 5: apenas em linfócitos B esparsos, não nas células neoplásicas; ++ expressão constante, definindo a entidade; + positivo; +/- mais frequentemente positivo; -/+ raramente positivo; - negativo. [Adaptado de PICCALUGA et al, 2011].

Referência de apoio:

Piccalunga PP, Agostinelli C, Tripodo C, Gazzola A, Bacci F, Sabbatini E, Pileri AS; for the European T-cell lymphoma study group peripheral T-cell lymphoma classification: the matter of cellular derivation. **Expert Rev Hematol** 2011; 4:415-425.

Apêndice 2 - Critérios clínicos bem estabelecidos na literatura

Suporte de estudo para descrições de siglas e conceitos clínicos Estadiamento e tratamento: Linfomas não Hodgkin e de Hodgkin

A) Linfomas não Hodgkin, história clínica

A história clínica dos pacientes com linfomas são variáveis, com padrões comuns, de acordo com o comportamento clínico dividindo-se os linfomas em três grandes grupos (quadro 3.1). Os mais agressivos são comuns em crianças e adolescentes e, embora tenham rápida evolução, respondem bem a quimioterapia e podem ser curados. Já os linfomas mais indolentes são comuns em idosos e, não respondem bem à quimioterapia e dificilmente são curáveis.

Quadro 8 - História clínica de pacientes com linfomas não Hodgkin

Indolentes	Agressivos	Muito Agressivos
Evolução longa	Evolução rápida	Formação de massas tumorais com evolução muito rápida
Linfadenopatia periférica	Linfadenopatia e envolvimento de sítios extranodais	Linfadenopatia e envolvimento de sítios extranodais
Raramente sintomas sistêmicos; comum envolvimento de medula óssea (exceto folicular)	Sintomas sistêmicos, com dor e obstrutivos em doença avançada.	Sintomas sistêmicos
Importante estudo de desidrogenase láctica, DHL		DHL e beta-2 microglobulina muito elevados (Burkitt)

Outros dados de relevância clínica: linfadenopatia periférica em LNH (60-70%); sintomas sistêmicos (sintomas B = perda de peso >10%, sudorese noturna, febre >38° C); quando presentes indicam pior prognóstico; são comuns em LNH agressivos e muito agressivos.

Fatores de risco LNH: infecção viral (HIV, HTLV-1, HBV, HCV, EBV, HHV8, *Helicobacter pylori*); colagenoses (doença reumatoide, síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso), imunodeficiência congênita, transplantes de órgãos, doença celíaca/*Crohn* (trato gastrointestinal). Alterações de exames laboratoriais: anemia, leucopenia ou trombocitopenia sem etiologia definida.

Exames clínicos: laboratoriais, biópsia linfonodal ou tecido suspeito, biópsia de medula óssea, imunofenotipagem/citogenética/biologia molecular determinado o subtipo de linfoma e importante para prognóstico; exames de imagens.

B) Resumo, estadiamento clínico

Quadro 9 - Escala de *Ann Arbor* para estadiamento de linfomas

Estádio	Definição
I	Linfoma acometendo uma única cadeia (IE) ou único sítio extranodal (IE)
II	Linfoma acometendo mais de uma cadeia linfonodal do mesmo lado do diafragma (II) ou com acometimento de um sítio extranodal por contiguidade (IIE)
III	Linfoma acometendo mais de uma cadeia linfonodal, de ambos os lados do diafragma (III), podendo ter acometimento de órgão extranodal por contiguidade (IIIE), ou baço (IIIS), ou ambos (IIIES)
IV	Linfoma disseminado, acometendo medula óssea e/ou acometimento de sítios extranodais sem contiguidade.
Designações: A – Sem sintomas sistêmicos; B – Com sintomas Sistêmicos (febre, perda de peso, sudorese noturna); E – Doença extranodal.	

Quadro 10 - Escala de índice de prognóstico internacional (IPI) para estadiamento de linfomas agressivos

Escores de riscos	Definição
0 a 5	Gravidade da doença diretamente proporcional ao número de pontos recebidos
0 ou 1	Baixo risco
2	Risco intermediário baixo
3	Risco intermediário alto
4 ou 5	Alto risco de recorrência
Fatores de risco contabilizados para os escores (1 ponto cada no IPI)	Idade (> 60 anos), DHL elevada, status diminuído (ECOG >2), estadiamento clínico <i>Ann Arbor</i> III ou IV, mais de um sítio
*Desenvolvido para fornecer previsão prognóstica em pacientes com linfomas tratados com CHOP	

Quadro 11 - Escala de índice de prognóstico internacional (IPI) para estadiamento de linfomas indolentes

Escores de riscos	Definição
0 ou 1	Baixo risco Sobrevida em 10 anos (85%)
2	Intermediário risco Sobrevida com o mesmo tempo de seguimento (60%)
3 ou mais	Alto risco; Sobrevida em 10 anos de 40%
Fatores de risco contabilizados para os escores	Idade >60 anos; DHL elevada; EC III ou IV, hemoglobina <12,0g/dl; número de sítios nodais envolvidos >4
*Baseado no mesmo princípio de utilização do IPI, desenhado para linfomas indolentes.	

C) Resumo, tratamento clínico comum aos linfomas não Hodgkin de acordo com o comportamento clínico

Quadro 12 - Linfomas indolentes (Folicular e Linfocítico)

CrITÉRIOS	Definição
Em geral, não é curativo	Doença avançada é comum o uso de 1=ciclofosfamida, 2=vincristina, 3=fludarabina e 4=prednisona, em combinações diversas (COP=1+2+4)
> 60 anos	Assintomáticos, sem tratamento, incurável em estágio avançado.
EC I-II	Radioterapia localizada, com possibilidade de cura, com recidivas tardias após mais de 10 anos, atualmente, menos recomendada a abordagem clínica.
Anticorpo CD20	Arma terapêutica recente, bons resultados para doença refratária; podendo ser utilizado como primeira linha de tratamento, combinado com outros agentes como fludarabina, ciclofosfamida ou ambos, e esquema CHOP=ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona .
Bleomicina	Combinado com esquema CHOP em período menos recente

Quadro 13 - Linfomas Agressivos (DGCB)

CrITÉRIOS	Definição
Tratamento padrão EC III-IV	CHOP, ciclofosfamida 750mg/m ² EV doxorubicina, 50 mg/m ² EV; vincristina, 1,4 mg/m ² EV, máximo de 2 mg; prednisona, 100 mg VO, de D1 ao D5 repetidos a cada 21 dias) associado a rituximab (anticorpo anti-CD 20) por 8 ciclos.
Anti-CD20	Indicado em todas as faixas etárias, com benefícios evidentes em idosos > 60 anos;
Radioterapia	Consolidação, para áreas inicialmente com doença volumosa, bulky
EC I-II	Tratamento básico CHOP com rituximab por 4 ciclos, seguido de radioterapia para campo envolvido
Doxorubicina	Deve ser usado após avaliação cardíaca devido a toxicidade do fármaco
Bleomicina	Combinado ao esquema CHOP em período menos recente.

Quadro 14 - Linfomas muito agressivos (Burkitt/Linfoblástico)

Critérios	Esquemas poliquimioterápicos de acordo com critérios de tratamentos de grupos nacionais ou internacionais (**):
Infantil	Esquemas com combinações de agentes quimioterápicos:
Citorredução	Altas doses de quimioterápicos; COP.
Indução	Exemplo: COPADM
Consolidação	Exemplo: CYM, CYVE.
21-60 anos	CODOX-M/IVAC; HIPER-CVAD
Esquemas variados	Em geral, com combinações ciclofosfamida, vincristina=oncovin, doxorrubicina, prednisona, metotrexate, asparaginase, citarabina, adriamicina, madit, aracityn, vepeside, leucovorin, ifosfamida, etoposide, mesna.
GBTL 1987(**)	Elaborado pelo grupo Brasileiro para tratamento de linfoma não Hodgkin na infância. Estádio I-II linfoma localizado, qualquer que fosse o local primário e III-IV, de acordo com o local primário, sem infiltração do SNC, e outro com infiltração do linfoma no SNC. Fases de tratamentos poliquimioterápicos: indução, manutenção. Nos casos com invasão do SNC, acréscimo da consolidação (fase I e II), manutenção (fase I e II).
GBTL 1996(**)	De acordo com o risco de recaída. Baixo risco, alto risco de células B: risco <i>standart</i> para recaída; risco intermediário e alto risco para recaída. Para cada situação é avaliado ciclos polioquimioterápicos (Ciclos A-E).
LMB89(**)	Protocolo estabelecido pela Sociedade Francesa de Oncologia Pediátrica/SJCRH. Grupo A, Indução (COPAD 2X); Grupo B Citorredução (COP); Indução (COPADM 2X), Consolidação (CYM 2X); Grupo C Citorredução e Indução (COPADM+CYM) + Consolidação (CYVE 2X)

D) Resumo, tratamento clínico comum aos linfomas de Hodgkin

Em complemento ao estadiamento *Ann Arbor*, grupo de estudo europeu (EORTEC) propõem estratégias de tratamento para linfomas de Hodgkin, com critérios de fatores de prognóstico favorável (EC I-II) com envolvimento de 3 ou >3 sítios nodais e idade < 50 anos, sem sintomas B. E, desfavorável, EC II com 4 sítios nodais envolvidos ou idade 50 anos, com sintomas B, massa tumoral mediastinal/tórax.

Quadro 15 - Esquemas terapêuticos para tratamento de linfoma de Hodgkin e prognóstico

Esquemas	Prognóstico
ABVD (3-4X), RT 30Gy	Favorável
ABVD (2X), RT 20Gy	Favorável
ABVD (4-6X), RT 30Gy	Desfavorável
ABVD (6-8X), RT 30-36Gy, com <i>bulky</i> inicial; PET positivo (doença residual)	Desfavorável
BEACOPP 8X, RT 30Gy	Desfavorável
MOPP	(**) Favorável

(*) **ABVD**= do inglês, adriamycin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine; **ABV**=drogas do ABVD, exceto dacarbazine; **BEACOPP**= do inglês, bleomycin, etoposide, adriamycin, cyclophosphamide, vincristin (oncovin), procarbazine, prednisone.

(**) **MOPP**=do inglês, mustargen (mechlorethamine, mustine, nitrogen mustard), vincristin (oncovin), procarbazine (natulan), prednisone). Primeiro protocolo desenvolvido para pacientes com linfoma de Hodgkin com sucesso terapêutico em 1960 (National Cancer Institute), Vicent DeVita, Jr., e aplicado com combinação alteranada ao **ABVD** ou **ABV**

E) REFERÊNCIAS UTILIZADAS PARA O ESTUDO:

Araújo LHL, Victorino APOS, Assad DX, et al. Linfoma não Hodgkin de alto grau, revisão da literatura. **Rev Bras Cancerol** 2008; 54:175-83.

Brusamolino E, Bacigalupo A, Barosi G, et al. Classical Hodgkin's lymphoma in adults: guidelines of the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology, and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation on initial work-up, management, and follow-up. **Haematologica** 2009; 94:550-65.

Connors JM, Klimo P, Adams G, et al. Treatment of advanced Hodgkin's disease with chemotherapy comparison of MOPP/ABV hybrid regimen with alternating courses of MOPP and ABVD: a report from the national cancer institute of Canada Clinical trials group. **J Clin Oncol** 1997; 15:1638-45.

Connors JM, Noordijk EM and Horning SJ. Hodgkin's lymphoma: basing the treatment on the evidence. **Am Soc Hematol** 2001; 178-93.

Duggan DB, Petroni GR, Jeffrey L et al. Randomized comparison of ABVD and MOPP/ABV hybrid for the treatment of advanced Hodgkin's disease: report of an intergroup trial. **J Clin Oncol** 2003; 4:607-14.

Eghbali H, Raemaekers J, Carde P. et al. EORTC Lymphoma Group. The EORTC strategy in the treatment of Hodgkin's lymphoma. **Eur J Haematol** 2005; 66:135-40.

Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE et al. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. **J Clin Oncol** 1986; 4:1470.

Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P, editores. **Hematology: basic principles and practice**. 3 ed. New York: Churchill Livingstone; 2000.

Kaminski MS, Tuck M, Estes J et al. 131I-tositumomab therapy as initial treatment for follicular lymphoma. **N Engl J Med** 2005; 352:441.

Keegan THM, Clarke CA, Chang ET, et al. Disparities in survival after Hodgkin lymphoma: a population based study. **Cancer Causes Control** 2009; 20:1881-92.

Mey U, Hitz F, Lohri A, et al. Diagnosis and treatment of diffuse large B cell lymphoma. **Swiss Med Wkly**. 2012; 142:w13511.

Pizza M. **Linfoma de Burkitt em crianças e adolescentes: avaliação clínica, correlação com marcadores biológicos e a pesquisa do vírus Epstein Barr.** Tese apresentada para o curso de pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, para obtenção do título de doutor em Medicina, 2007, 87 páginas.
ANEXO 4. Protocolos para tratamentos de pacientes com Burkitt (GBTL): 66-73p.

Patte C, Auperin A, Michon J, et al. The Société Française d'Oncologie Pédiatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphoma and L3 leukemia. **Blood** 2001; 97:3370-9.

Souza EM, Baiocchi OCG, Zanichelli MA et al. Comparison between hybrid MOPPABV and ABVD chemotherapy protocols for Hodgkin's lymphoma in public hospitals of the largest South American city – a retrospective 14 year study. **Ann Hematol** 2009; 88:633-7.

The NCI Center for Cancer Research (CCR) conducts clinical trials at the NIH Clinical Center in Bethesda, Maryland: acesso em 1-6-2012. Endereço eletrônico: <http://bethesdatrials.cancer.gov/lymphoma/index.aspx>.

Zerbini MCN, Soares FA, Moraes JCM et al. Classificação dos tumores hematopoéticos e linfóides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição. **Bras Patol Med Lab** 2011; 47:643-8.