

# **COMPARAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM LINFOMAS DE HODGKIN CLÁSSICO**

**FELIPE D'ALMEIDA COSTA**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto  
Soares**

**Co-Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros  
Coutinho Camillo**

**São Paulo**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Costa, Felipe D'Almeida

**Comparação entre os perfis de expressão de microRNAs em linfomas de Hodgkin clássico** / Felipe D'Almeida Costa – São Paulo, 2019. 105p.

Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. Linfoma/Lymphoma. 2. Linfoma de Hodgkin/Lymphoma, Non-Hodgkin. 3. MicroRNAs/MicroRNAs. 4. Perfil de Expressão Gênica/Gene Expression Profiling. 5. Transcrição Genética/Transcription, Genetic. 6. Imuno-Histoquímica/ Immunohistochemistry. 7. Recidiva/ Recurrence. 8. Ciclo Celular/Cell Cycle. 9. Apoptose/Apoptosis.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

- Arthur Schopenhauer

## DEDICATÓRIA

À minha família, que sempre foi o alicerce para que eu pudesse construir minhas próprias obras. À minha mãe, Tânia de Fátima D'Almeida Costa e meu pai, Josino da Costa Neto, que me serviram de exemplo de cidadãos trabalhadores e de bom coração. Dois seres humanos formidáveis que nunca mediram esforços para proporcionar aos seus filhos o maior legado que os pais podem deixar aos seus descendentes: uma educação de qualidade e baseada nos ensinamentos do cristianismo. Às minhas irmãs, Juliana D'Almeida Costa e Daniela D'Almeida Costa, pela amizade e parceria de todos esses anos lado a lado, vivenciando as delícias e entraves passageiros de uma verdadeira fraternidade. À minha avó, Suzeth Duarte D'Almeida, pela enorme força e determinação, ainda persistentes no auge de sua oitava década de vida. À minha esposa amada Stephania Martins Bezerra, com quem compartilho todos os momentos da vida dos últimos 9 anos e com quem divido o peso das dificuldades, servindo um ao outro de apoio mútuo para superar todos os obstáculos. Que me deu a felicidade de ser pai de dois filhos, Alice Bezerra Costa e Lucas Bezerra Costa, aquela com 2 anos e este ainda no ventre da mãe. A estes e a todos os demais familiares, dedico a execução e defesa deste projeto.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha esposa, Dra. Stephania Martins Bezerra, pelo suporte incondicional à todas as atividades profissionais nas quais me encontro envolvido.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por sempre acreditar na minha capacidade enquanto patologista e pesquisador.

À minha co-orientadora, Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, pelo inestimável apoio científico na execução deste projeto.

À Srta. Katia Klug Oliveira, pelo auxílio técnico na execução dos procedimentos.

Ao Dr. Antônio Hugo José Froes Marques Campos, por ajudar a viabilizar os recursos financeiros necessários através do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON).

Ao Dr. Marcos Pedro Guedes Camandaroba, pelo auxílio na aquisição das informações clínicas da forma mais precisa e adequada.

Ao Sr. Israel Tojal da Silva, do Departamento de Bioestatística do CIPE pelo suporte estatístico.

Ao Sr. Vinicius Calsavara, do Departamento de Bioestatística do CIPE pelo suporte estatístico.

Ao Dr. Antônio Geraldo do Nascimento, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, por todos estes anos de ensinamentos e amizade na vida de Patologista.

Aos demais colegas patologistas do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, por todo o incentivo à produção científica e aprimoramento contínuo do tirocínio, bem como pela compreensão diante das necessidades de ausência para a realização deste projeto.

À Dra. Vilma Regina Martins, superintendente de pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, pelo apoio necessário diante das adversidades, que não hesitou em disponibilizar recursos através do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Oncogenômica e Inovação Terapêutica (INCITO-INOTE), da FAPESP/CNPq/CAPES.

A todos os meus amigos, sejam aqueles mais próximos e também os que se encontram mais distantes e vem de muitos anos atrás, que tem me acompanhado ao longo desta jornada da vida.

Aos diretores e funcionários do Programa de Pós-graduação da Fundação Antônio Prudente, pelo trabalho de excelência que desempenham e pelo constante estímulo aos seus pós-graduandos.

À Sra. Suely Francisco do Núcleo de apoio ao aluno, pelo extremo zelo e dedicação às dissertações e teses desta instituição.

Ao Laboratório de Patologia Investigativa do A.C.Camargo Cancer Center, aqui representado pelo Sr. Severino da Silva Ferreira, por todo suporte e colaboração ao longo deste e de todos os outros projetos.

A todos aqueles, que por uma questão de espaço não foram aqui mencionados, mas que colaboraram direta ou indiretamente para o desenvolvimento, execução e conclusão deste projeto.

## RESUMO

Costa FD. **Comparação entre os perfis de expressão de microRNAs em Linfomas de Hodgkin Clássico**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

**Introdução:** Linfoma de Hodgkin (LH) é um dos linfomas mais frequentes no mundo ocidental, com cerca de 3 a 4 novos casos a cada 100 mil pessoas. Os microRNAs são pequenas moléculas que regulam a transcrição gênica e estão associadas ao desenvolvimento e progressão das neoplasias. Em LH clássico (LHC), alguns microRNAs já foram identificados a partir de células infectadas pelo EBV. Além destes, outros microRNAs já foram descritos em LHC, tanto em estudos onde foram realizadas esta avaliação em culturas celulares como utilizando a massa tumoral total de linfonodos, mas com pouca correlação com o comportamento biológico. **Objetivo:** O presente estudo tem como objetivo principal avaliar o perfil de expressão de microRNA em LHC, comparando casos livres de doença após a terapia com casos que exibiram recidivas. **Material e métodos:** Foram avaliados 106 pacientes com o diagnóstico de LHC, sendo coletados dados clínicos e avaliados os marcadores imuno-histoquímicos CD30, CD15, CD20 e CD15 destes casos, além da presença de EBV por CISH. Vinte casos foram selecionados para a avaliação da expressão de 377 microRNAs, 10 casos com recidiva e 10 casos sem evidência de doença. Como grupos comparadores, foram selecionadas 8 amostras de linfonodos reativos, 4 com hiperplasia folicular e 4 com hiperplasia paracortical. Os resultados do perfil de expressão foram submetidos ao método de agrupamento hierárquico não supervisionado. **Resultados e discussão:** Os parâmetros clínico-patológicos desta coorte não diferiram daqueles encontrados na literatura. A sobrevida global e a sobrevida livre de progressão foram de 92,1% e 83,6% em 5 anos, respectivamente. Os fatores associados ao prognóstico em análise multivariada foram idade, níveis séricos de albumina e DHL e

estadiamento. O perfil de expressão dos microRNAs de todos os casos de LHC possibilitaram a separação completa dos mesmos em relação aos linfonodos reativos, independentemente do tipo de hiperplasia. Na comparação entre os casos de LHC, foram identificados 3 microRNAs diferencialmente expressos: miR-502-3p e miR-363, ambos hipoexpressos no grupo que continha todos os casos com recidivas e miR-886-5p, hiperexpresso neste grupo. Os dois primeiros microRNAs estão associados a supressão tumoral, através da inibição da proliferação e migração celular. O miR-886-5p é associado ao aumento da proliferação celular e inibição da apoptose. Em linfomas, este já foi descrito como estando hiperexpresso em linfomas T, incluindo linfoma anaplásico de grandes células. **Conclusão:** Os LHC possuem um perfil distinto de expressão de microRNAs, com muitos deles envolvendo mecanismos fundamentais na oncogênese, como ciclo celular e apoptose. Os microRNAs encontrados diferencialmente expressos nos casos recidivados no presente estudo podem estar associados ao comportamento menos indolente destas neoplasias, podendo ser alvo de futuras investigações, incluindo seu uso como potenciais alvos de terapia.

**Descritores:** Linfoma. Linfoma de Hodgkin. MicroRNAs. Perfil de Expressão Gênica. Transcrição Genética. Imuno-Histoquímica. Recidiva. Ciclo Celular. Apoptose.



## SUMMARY

Costa FD. [Comparison between microRNA expression profiles in Classic Hodgkin Lymphoma]. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

**Introduction:** Hodgkin lymphoma (HL) is one of the most common lymphomas in the western world, with about 3 to 4 new cases per 100,000 people. MicroRNAs are small molecules that regulate gene transcription and are associated with the development and progression of neoplasms. In classic HL (CHL), some microRNAs have already been identified from EBV-infected cells. In addition, other microRNAs have already been described in CHL, both in studies where this evaluation was performed in cell cultures and using whole lymph node tumor tissue, but with little correlation with biological behavior. **Objective:** The present study aims to evaluate the microRNA expression profile in CHL, comparing disease-free cases after therapy with cases that showed recurrences. A total of 106 patients diagnosed with CHL were evaluated. Clinical data were collected and the immunohistochemical markers CD30, CD15, CD20 and CD15 of these cases were evaluated, as well as the presence of EBV by CISH. Twenty cases were selected for the analysis of the expression of 377 microRNAs, 10 cases with recurrences and 10 cases without evidence of disease. For comparison, 8 samples of reactive lymph nodes were selected, 4 with follicular hyperplasia and 4 with paracortical hyperplasia. The expression profile results were submitted to the unsupervised hierarchical clustering method. **Results and discussion:** The clinico-pathological parameters of this cohort did not differ from those found in the literature. Overall survival and progression-free survival were 92.1% and 83.6% at 5 years, respectively. Factors associated with prognosis in multivariate analysis were age, serum albumin and DHL levels, and staging. The microRNA expression profile of all CHL cases allowed their complete separation from reactive lymph nodes, regardless of the type of hyperplasia.

When comparing the cases of CHL, 3 differentially expressed microRNAs were identified: miR-502-3p and miR-363, both hypoexpressed in the group containing all relapsed cases and miR-886-5p, hyperexpressed in this group. The first two microRNAs are associated with tumor suppression through inhibition of cell proliferation and migration. The miR-886-5p is associated with increased cell proliferation and inhibition of apoptosis. In lymphomas, it has been described as being overexpressed in T-cell lymphomas, including anaplastic large cell lymphoma. **Conclusion:** CHLs have a distinct microRNA expression profile, with many involving key mechanisms in oncogenesis, such as cell cycle and apoptosis. The differentially expressed microRNAs found in the relapsed cases in the present study may be associated with the less indolent behavior of these neoplasms and may be the subject of future investigations, including their use as potential therapeutic targets.

**Key-words:** Lymphoma. Hodgkin's Lymphoma. MicroRNAs. Gene Expression Profiling. Transcription, Genetic. Immunohistochemistry. Recurrence. Cell Cycle. Apoptosis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Thomas Hodgkin e a obra que o consagrou na medicina .....	2
<b>Figura 2</b>	Ilustração original de Dorothy Reed, das células que atualmente conhecemos como células de Hodgkin/Reed-Sternberg .....	3
<b>Figura 3</b>	Características histopatológicas morfológicas do Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular .....	7
<b>Figura 4</b>	Perfil imunistoquímico típico das células de Hodgkin/Reed-Sternberg no Linfoma de Hodgkin clássico.....	8
<b>Figura 5</b>	Biogênese e mecanismo de ação dos microRNAs.....	17
<b>Figura 6</b>	Fluxograma de seleção das amostras e plano de trabalho do projeto.....	25
<b>Figura 7</b>	Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevida global geral dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico .....	40
<b>Figura 8</b>	Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico ....	40
<b>Figura 9</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais, estratificada pela idade dos pacientes.....	41
<b>Figura 10</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais .....	41

<b>Figura 11</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais, estratificada pelos níveis séricos de DHL .....	42
<b>Figura 12</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais, estratificada pelo estadiamento clínico de Ann Arbor.....	42
<b>Figura 13</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à terapia empregada .....	43
<b>Figura 14</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica, estratificada pela presença de expressão de CD20 nas células HRS.....	43
<b>Figura 15</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica .....	44
<b>Figura 16</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica, estratificada pela porcentagem de linfócitos B CD20-positivos no microambiente tumoral .....	44
<b>Figura 17</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica, estratificada pela porcentagem de linfócitos T CD3-positivos no microambiente tumoral.....	45
<b>Figura 18</b>	Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pelo estadiamento Ann Arbor .....	46
<b>Figura 19</b>	Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pelos níveis séricos de albumina .....	46

<b>Figura 20</b>	Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pela porcentagem de células CD20-positivas no microambiente tumoral .....	47
<b>Figura 21</b>	Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pela porcentagem de células CD3-positivas no microambiente tumoral .....	47
<b>Figura 22</b>	Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pela porcentagem de células CD15-positivas no microambiente tumoral .....	48
<b>Figura 23</b>	Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada quanto à presença ou ausência de expressão de CD20 nas células neoplásicas .....	48
<b>Figura 24</b>	Heatmap da análise da expressão dos microRNAs para todos os casos de Linfomas de Hodgkin clássico e linfonodos reativos.....	50
<b>Figura 25</b>	Heatmap demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia folicular .....	53
<b>Figura 26</b>	Heatmap demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia paracortical.....	55

<b>Figura 27</b>	Heatmap demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidiva e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia folicular .....	57
<b>Figura 28</b>	Heatmap demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidiva e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia paracortical.....	59
<b>Figura 29</b>	Heatmap demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidiva e aqueles sem evidência de doença .....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Comparação imuno-histoquímica entre as células neoplásicas de Linfoma de Hodgkin clássico (LHC) e Linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular (LHPLN) .....	5
<b>Tabela 2</b>	Sistema de estadiamento revisado para linfomas nodais primários (classificação de Lugano) .....	12
<b>Tabela 3</b>	Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico.....	36
<b>Tabela 4</b>	Dados histopatológicos, imuno-histoquímicos e de hibridização in situ dos pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico .....	38
<b>Tabela 5</b>	Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de linfonodos reativos, com padrão de hiperplasia folicular ou hiperplasia paracortical .....	51
<b>Tabela 6</b>	Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e linfonodos reativos com hiperplasia folicular .....	52
<b>Tabela 7</b>	Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e linfonodos reativos com hiperplasia paracortical .....	54

<b>Tabela 8</b>	Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva e linfonodos reativos com hiperplasia folicular .....	56
<b>Tabela 9</b>	Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva e linfonodos reativos com hiperplasia paracortical .....	58
<b>Tabela 10</b>	Comparação entre os microRNAs diferencialmente expressos nas amostras de Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva e aqueles sem evidência de doença após a terapia.....	60



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ABI</b>	Applied Biosystem
<b>ABVD</b>	Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina
<b>BCL2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BEACOPP</b>	Bleomicina, Etoposídeo, Adriamicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina e Prednisona
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CISH</b>	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
<b>CM</b>	Celularidade mista
<b>COPP/ABV</b>	Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina e Prednisona/ Adriamicina, Bleomicina e Vinblastina
<b>Ct</b>	<i>threshold-cycle</i>
<b>DL</b>	Depleção linfocitária
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EBV</b>	Vírus de Epstein-Barr
<b>EN</b>	Esclerose nodular
<b>FC</b>	<i>Fold Change</i>
<b>HF</b>	Hiperplasia folicular
<b>HP</b>	Hiperplasia paracortical
<b>HPF</b>	<i>High Power Field</i>
<b>HRS</b>	Hodgkin/Reed-Sternberg
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>Ki-67</b>	Proteína Nuclear Associada à Proliferação Celular
<b>LH</b>	Linfoma de Hodgkin
<b>LHC</b>	Linfoma de Hodgkin clássico
<b>LHPLN</b>	Linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular
<b>Mcl-1</b>	<i>Myeloid cell leucemia 1</i>
<b>miR</b>	microRNA
<b>miRNA</b>	microRNA

<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>p53</b>	Proteína Citoplasmática de Massa Molecular 53 kDa
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PET-CT</b>	Tomografia computadorizada por emissão de pósitron
<b>qRT-PCR</b>	<i>Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RISC</b>	<i>RNA induced silencing complex</i>
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RL</b>	Rico em linfócitos
<b>RS</b>	Reed-Sternberg
<b>TF</b>	<i>Transcription Factor</i>
<b>TMA</b>	<i>Tissue microarray</i>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Visão geral.....	1
1.2	Linfoma de Hodgkin clássico .....	5
1.2.1	Características clínico-epidemiológicas e patológicas.....	5
1.2.2	Diagnóstico diferencial .....	10
1.2.3	Estadiamento.....	11
1.2.4	Tratamento .....	13
1.3	Associação do vírus de Epstein-Barr com o Linfoma de Hodgkin clássico.....	14
1.4	MicroRNAs associados ao Linfoma de Hodgkin Clássico .....	15
1.5	Linfoma de Hodgkin clássico – prognóstico e biomarcadores .....	20
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
3.1	Objetivo Geral.....	22
3.2	Objetivos Específicos .....	22
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	Visão Geral do Projeto e Aspectos Éticos .....	23
4.2	Casuística.....	23
4.3	Avaliação imuno-histoquímica .....	26
4.4	Confecção de tissue microarray (TMA) para avaliação da presença do vírus de Epstein-Barr .....	26
4.5	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica (CISH) para EBV .....	27
4.6	Seleção para extração de RNA .....	28
4.7	Extração de RNA total .....	29
4.8	Avaliação da expressão dos miRNAs.....	30
4.8.1	Síntese do cDNA .....	30
4.8.2	Amplificação do cDNA e Análise da Expressão de microRNAs .....	31
4.9	Análise estatística.....	32

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
5.1	Descrição da casuística – aspectos clínicos e laboratoriais .....	34
5.2	Descrição da casuística: aspectos histopatológicos, imuno- histoquímicos e de hibridização <i>in situ</i> .....	36
5.3	Correlação de parâmetros clínico-patológicos com dados de sobrevida	39
5.4	Análise da expressão dos microRNAs .....	49
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
6.1	Visão geral.....	62
6.2	Dados clínico-patológicos.....	63
6.3	Correlação com dados de sobrevida .....	64
6.4	Perfil de expressão de microRNAs.....	65
6.4.1	Comparação com linfonodos reativos .....	68
6.4.1.1	miR-21.....	70
6.4.1.2	miR-155.....	71
6.4.1.3	miR-9.....	73
6.4.1.4	miR-337-5p .....	74
6.4.1.5	miR-382.....	75
6.4.2	Comparação entre os casos de Linfoma de Hodgkin clássico .....	78
6.4.2.1	miR-502-3p .....	79
6.4.2.2	miR-363.....	81
6.4.2.3	miR-886-5p .....	84
6.5	Considerações finais .....	90
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>94</b>

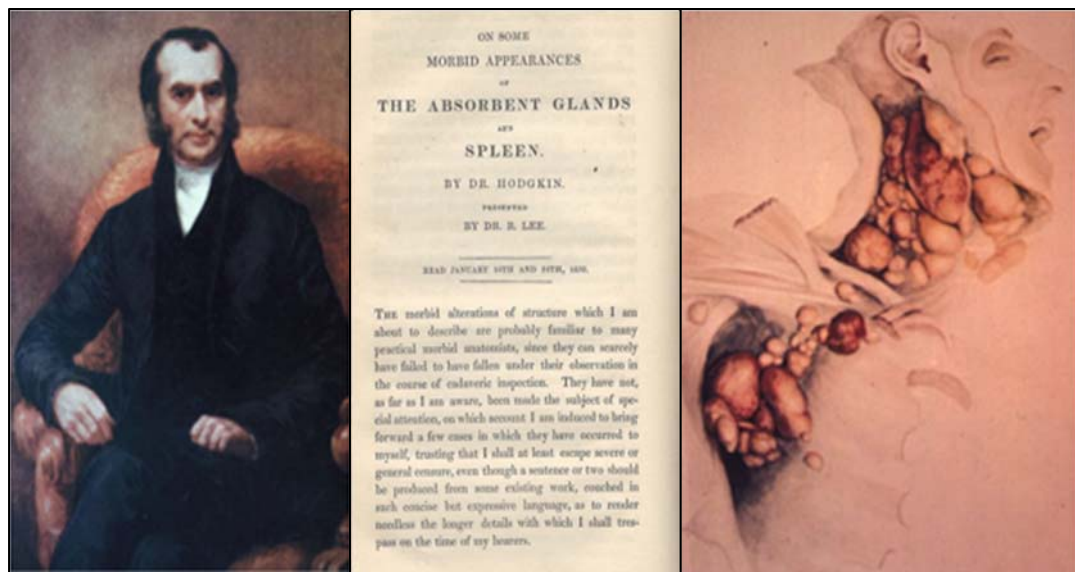
## ANEXOS

**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 VISÃO GERAL

Linfoma de Hodgkin (LH) é um dos linfomas mais frequentes no mundo ocidental, com cerca de 3 a 4 novos casos a cada 100 mil pessoas. Foi inicialmente descrito pelo médico patologista inglês Thomas Hodgkin (1798-1865), com base na observação clínica e macroscópica de autópsias de pacientes com aumento de linfonodos e baço, em um manuscrito datado de janeiro de 1832, intitulado “Em alguns aspectos mórbidos das glândulas absorventes e baço” (do inglês “On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen” - Figura 1) (GELLER e TAYLOR 2013).

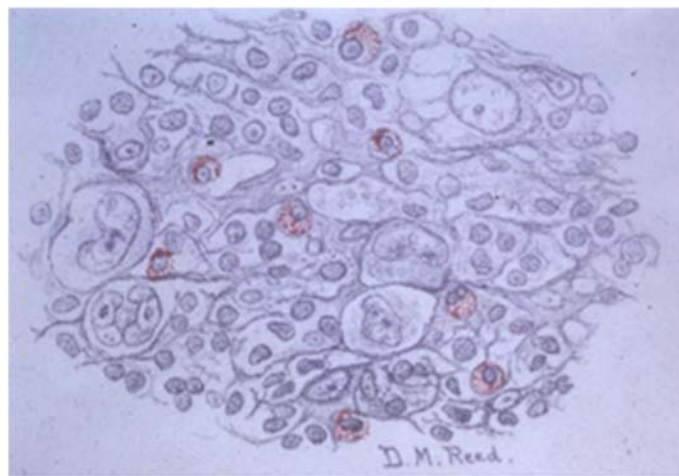


Fonte: GELLER e TAYLOR (2013).

**Figura 1** - Thomas Hodgkin e a obra que o consagrou na medicina. À esquerda, representação do médico, que se dedicava ao estudo de autópsias no Guy's Hospital em Londres. Ao centro, a primeira página da publicação original de 1832. À direita, desenho colorido do caso 7 da série original, demonstrando múltiplos linfonodos aumentados desde a região cervical até o mediastino.

Curiosamente, apesar de já ter tido experiência com microscopia, as descrições iniciais de Hodgkin não abordaram estes aspectos, entretanto foram fundamentais para caracterizar a natureza de envolvimento preferencial de cadeias linfonodais contíguas, com predileção pelas cadeias cervicais e mediastinais. Entretanto, foi somente em 1902, em uma publicação de autoria de Dorothy Reed, com referência ao trabalho do austríaco Carl Sternberg, que a célula diagnóstica associada ao Linfoma de Hodgkin foi descrita: uma célula gigante e peculiar, que já havia sido observada por outros patologistas anteriormente, mas pela primeira vez mostrava-se relacionada a esta doença. O próprio Sternberg a havia descrito como associada à tuberculose, então cabe a Reed o crédito pela afirmação

que o reconhecimento destas células ao exame microscópico era suficiente para o diagnóstico do Linfoma de Hodgkin. Foi então que surgiu o conceito da célula de Reed-Sternberg, que para creditar também o autor da descrição original da doença, atualmente conhecemos como célula de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS-Figura 2) (Reed 1902, citado por GELLER e TAYLOR 2013, p.361).



**Fonte:** Reed (1902), citado por GELLER e TAYLOR (2013, p.361).

**Figura 2** - Ilustração original de Dorothy Reed, das células que atualmente conhecemos como células de Hodgkin/Reed-Sternberg.

Além dos aspectos descritos por Hodgkin e as células diagnósticas, os linfomas de Hodgkin são caracterizados pelo envolvimento nodal por uma mistura de células inflamatórias maduras e não neoplásicas, que predominam na composição das massas tumorais. Fibrose intersticial ou sob a forma de bandas escleróticas podem estar presentes. Apesar da utilização da mesma terminologia, existem dois tipos histológicos de Linfoma de Hodgkin, o Linfoma de Hodgkin clássico (LHC) e o Linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular (LHPLN). Eles representam entidades

nosológicas distintas, com importantes diferenças histológicas, imunohistoquímicas e moleculares (SWERDLOW et al. 2017).

Enquanto que no LHPLN as células neoplásicas, que são conhecidas como células linfo-histiocíticas (LH), exibem um fenótipo normal de células B do centro germinativo, as células tumorais do Linfoma de Hodgkin clássico, que nesta entidade são as células de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS), possuem uma citomorfologia característica, sendo células grandes e multinucleadas derivadas de células B pré-apoptóticas do centro germinativo. Elas exibem perda parcial do fenótipo de células B, frequente expressão de CD30 e CD15 e podem ter associação com o vírus de Epstein-Barr (EBV) em cerca de um terço dos casos, a depender do subtipo histológico (Tabela 1) (GIBCUS et al. 2009; JOHNSON et al. 2015).

Como o presente projeto tem como propósito principal a avaliação de casos de Linfoma de Hodgkin clássico, a partir de então as informações contidas neste texto irão priorizar esta entidade, pois apesar do mesmo nome, as diferenças entre LHC e LHPLN são tão marcantes que não permitem comparação entre as características de seus pacientes para fins de pesquisa científica.



**Tabela 1** - Comparação imuno-histoquímica entre as células neoplásicas de Linfoma de Hodgkin clássico (LHC) e Linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular (LHPLN).

Marcador	LHC	LHPLN
CD20	-/+	+
Pax-5	+/-	+
CD79a	-/+	+
OCT2	-/+	+
BOB1	-	+
CD30	+	-
CD15	+/-	-
LMP-1	+/-	-
CD3	-	-
CD45	-	+

**Legenda:** +: positivo em virtualmente todos os casos; -: negativo em virtualmente todos os casos; +/-: positivo na maioria dos casos; -/+: positivo na minoria dos casos.

**Fonte:** SWERDLOW et al. (2017).

## 1.2 LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

### 1.2.1 Características clínico-epidemiológicas e patológicas

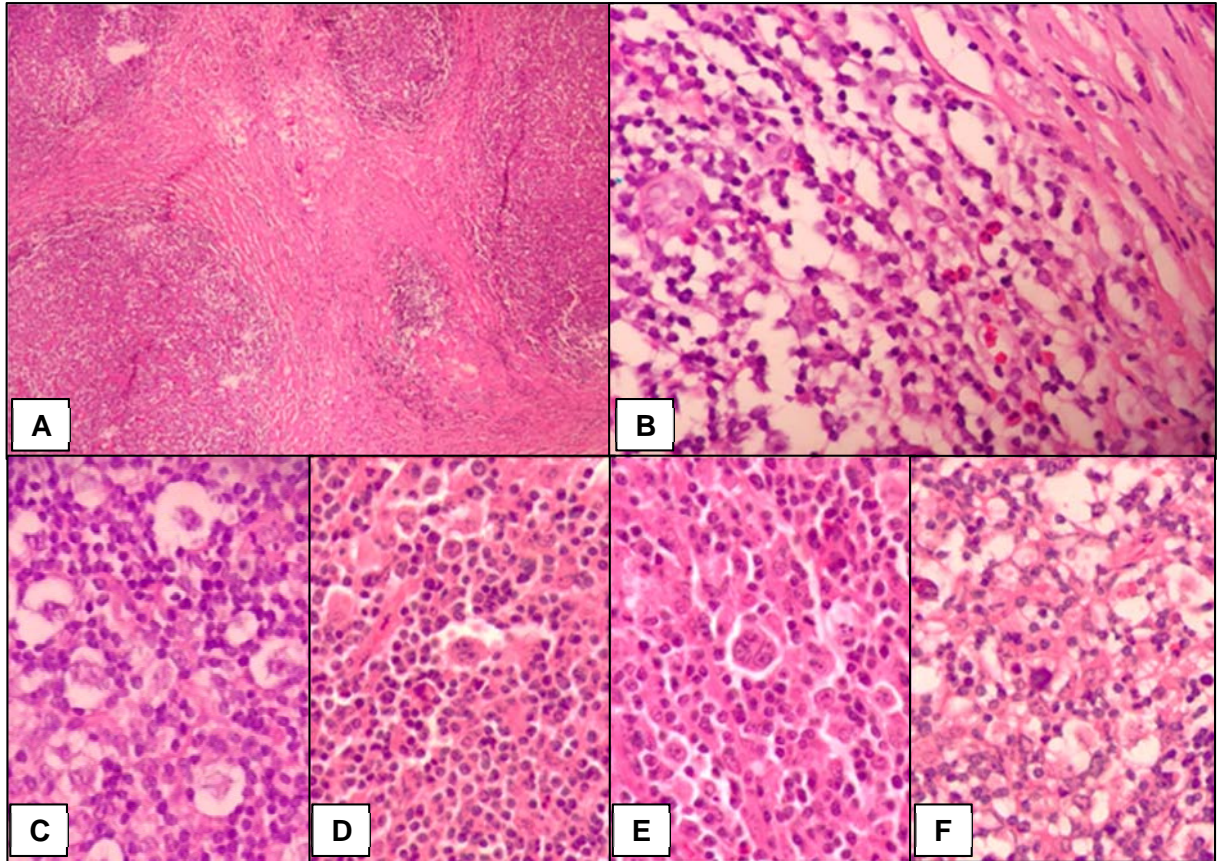
Cerca de 90% dos casos de Linfoma de Hodgkin são LHC. Dentro desta entidade há 4 subtipos histopatológicos, com diferenças de epidemiologia, apresentação clínico-patológica e associação com o EBV. São eles: esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM), rico em linfócitos (RL) e depleção linfocitária (DL) (SHANBHAG e AMBINDER 2018).

O subtipo mais comum é o denominado esclerose nodular, responsável por cerca de 70% dos casos de LHC em regiões desenvolvidas, como por exemplo os Estados Unidos e Europa (SHANBHAG e AMBINDER 2018). No Brasil, áreas também desenvolvidas, como o estado de São

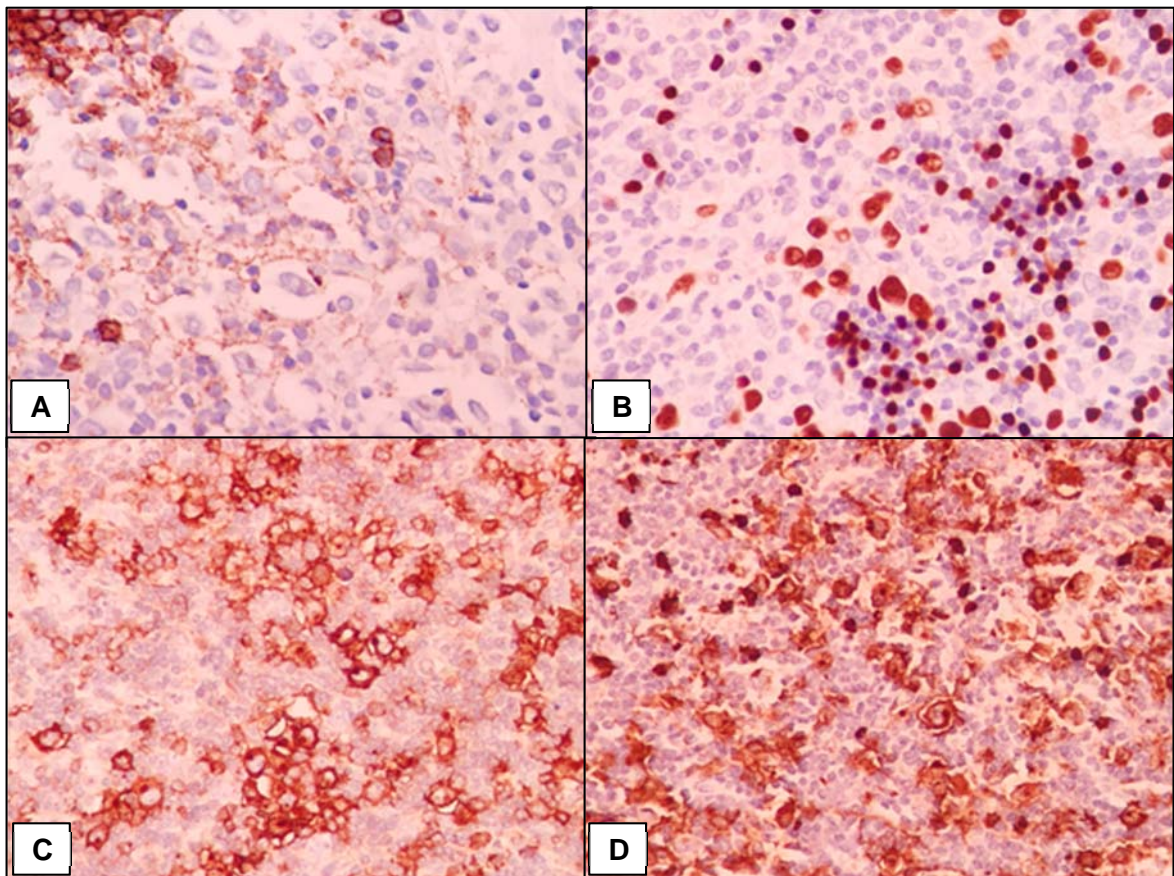
Paulo, apresentam taxas de LHCEN similares às taxas americanas e europeias (CAMPOS et al. 2018). Este subtipo exibe um pico de incidência entre 15 e 34 anos, sem diferença entre os sexos (MORTON et al. 2006). O envolvimento do mediastino ocorre em cerca de 80% dos casos. Grandes volumes de doença, definidos como massas tumorais medindo 7,5 cm ou mais (doença *bulky*), estão presente em cerca de metade dos casos. Além do mediastino, a região cervical encontra-se frequentemente comprometida. Clinicamente, além do aumento de volume dos linfonodos, ao redor de 40% dos pacientes exibem sintomas B ao diagnóstico (febre, sudorese noturna e perda de peso significativa). De acordo com o estadiamento de Ann Arbor, a maioria dos casos se apresenta em estágio II (SWERDLOW et al. 2017).

Histologicamente, este subtipo apresenta comumente espessas bandas de fibrose delimitando nódulos hiperclulares, com espessamento da cápsula nodal. Nestes nódulos, são encontradas as células HRS e suas variantes, particularmente a células conhecidas como lacunares, em meio a pequenos linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (Figura 3). O perfil imuno-histoquímico é o mesmo descrito acima para as células HRS: expressão de CD30 e virtualmente todos os casos, CD15 em cerca de 80% das amostras e Pax-5 expresso na maioria dos casos, em geral com intensidade de expressão mais fraca que os linfócitos B adjacentes. Este achado, juntamente com a frequente ausência ou redução de expressão de CD20 e CD79a, denota uma redução da expressão dos marcadores habituais de células B, uma das características que possibilita o diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico (Figura 4) (PIÑA-OVIEDO e MORAN 2016;

SWERDLOW et al. 2017). A frequência de positividade para o EBV varia entre 10 a 25% (HERBST et al. 1990, 1991).



**Figura 3** - Características histopatológicas morfológicas do Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular. A arquitetura dos linfonodos comprometidos é distorcida por espessas traves de fibrose, delimitando nódulos mais celulares (A, Hematoxilina & Eosina (H&E), 40x). A maior parte das células que compõe os nódulos são pequenos linfócitos, macrófagos, plasmócitos e granulócitos, em especial eosinófilos (B, H&E 200x). De permeio a este infiltrado polimórfico, as variedades de células HRS podem ser encontradas, desde células lacunares (C, H&E, 400x), células HRS bi- e multinucleadas (D e E, respectivamente, H&E, 400x), até células mumificadas, uma célula cujo ciclo celular foi paralisado em um estágio pré-apoptótico, o que explica seu citoplasma densamente eosinofílico e seu núcleo de aspecto picnótico, que pode ser observada próximo ao centro da imagem em 'F' (H&E, 400x).



**Figura 4** - Perfil imunoistoquímico típico das células de Hodgkin/Reed-Sternberg no Linfoma de Hodgkin clássico. A maioria dos casos não expressa CD20; quando a expressão está presente, em geral ela é fraca, heterogênea e somente em uma parte das células neoplásicas (A, CD20, 400x). Dos marcadores de células B, o que costuma estar frequentemente expresso é o Pax-5, ainda que numa intensidade menor que dos linfócitos B adjacentes, como ilustrado em 'B' (Pax-5, 400x). A expressão de CD30 está presente em virtualmente todos os casos, com um padrão de marcação de membrana, com frequente acentuação na região do complexo de Golgi, que aparece à microscopia como uma marcação globular (em 'dot') paranuclear (C, CD30 200x). Outro marcador frequentemente expresso (cerca de 80% dos casos) é o CD15, que também marca a membrana das células neoplásicas e pode acentuar o Golgi (D, CD15 200x).

O subtipo celularidade mista é o segundo mais encontrado, sendo responsável por cerca de 20% dos casos de LHC. Este subtipo acomete mais frequentemente os linfonodos periféricos, sendo raro o envolvimento do mediastino. É mais associado a baixas condições socioeconômicas. Em regiões desenvolvidas, pode ser encontrado em crianças ou indivíduos imunocomprometidos, como aqueles infectados pelo HIV. Há predileção pelo sexo masculino (70%), com idade mediana de incidência de 38 anos. Ao exame histopatológico, não há bandas de fibrose nem espessamento capsular, podendo ocorrer um padrão de infiltração interfolicular nos linfonodos comprometidos. As células HRS são típicas e o fundo também exibe um infiltrado inflamatório polimórfico. O perfil imunoistoquímico é semelhante ao descrito anteriormente para LHC, com a diferença de haver uma alta frequência de positividade para o antígeno latente de membrana tipo 1 (LMP-1) do EBV, expresso em 75% dos casos (SWERDLOW et al. 2017).

Os pacientes portadores de casos classificados como rico em linfócitos costumam ser mais velhos que os demais subtipos, ocorrendo mais em homens que mulheres. LHCRL representa somente 5% dos casos de LHC, com comprometimento mais frequente de linfonodos periféricos. A maioria dos casos se apresenta inicialmente com doença localizada e sem sintomas B, características que podem se sobrepor a Linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular. Esta sobreposição também ocorre do ponto de vista microscópico; LHCRL se apresenta geralmente com um padrão nodular, com algumas células HRS e um fundo composto por

numerosos linfócitos pequenos. Enquanto que os aspectos morfológicos se assemelham ao LHPLN, o perfil imuno-histoquímico é o tipicamente presente no LHC, o que auxilia na definição diagnóstica (ANAGNOSTOPOULOS et al. 2000).

O subtipo mais raro, constituindo menos de 1% dos casos, particularmente na era pós terapia antirretroviral para o HIV, é o depleção linfocitária. Este acomete mais pacientes do sexo masculino portadores do HIV e histologicamente é caracterizado por numerosas células neoplásicas e um escasso componente inflamatório de fundo. Há forte associação com o EBV e os pacientes portadores deste subtipo geralmente possuem fatores prognósticos adversos e evolução mais agressiva (SWERDLOW et al 2017).

### **1.2.2 Diagnóstico diferencial**

O diagnóstico diferencial do ponto de vista clínico inclui as outras doenças que podem cursar com linfadenomegalias, como doenças infecciosas e auto-imunes, além de outras neoplasias, como metástases linfonodais. No caso do mediastino, os tumores de células germinativas também fazem parte do diagnóstico diferencial. Digno de nota, 3 dos casos inicialmente descritos por Thomas Hodgkin, a posteriori confirmaram-se tratar de outras doenças. Um deles era uma tuberculose ganglionar, o outro correspondia a uma sífilis e um terceiro tratava-se de um outro linfoma que não pôde ser especificado. Para confirmação diagnóstica é necessária realização de biópsia, preferencialmente excisional; uma biópsia por agulha pode ser adequada, quando representativa. Independente do método, é

fundamental a avaliação imuno-histoquímica (FORTEZA-VILA e FRAGA 2010; HOPPE et al. 2018).

Histologicamente, os principais diagnósticos diferenciais em amostras adequadas são outros linfomas, como o próprio Linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular, Linfomas difusos de grandes células B, particularmente o Linfoma de grandes células B primário do mediastino e o Linfoma Anaplásico de Grandes Células, em especial a forma ALK-positiva, que pode se apresentar com um aspecto semelhante ao LHCEN. A avaliação criteriosa da morfologia, em conjunção com os aspectos clínicos e marcadores imuno-histoquímicos, é capaz de levar ao diagnóstico correto na maioria dos casos (FORTEZA-VILA e FRAGA 2010).

### **1.2.3 Estadiamento**

Uma vez estabelecido o diagnóstico de LHC, é necessário realizar o estadiamento do paciente. Nesta etapa está incluído o exame físico para avaliar as adenomegalias e organomegalias, além de tomografias computadorizadas com contraste endovenoso, abrangendo preferencialmente pescoço, tórax, abdômen e pelve, bem como a realização de tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-CT). O *guideline* do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), versão 1 de 2019, recomenda a realização de biópsia de medula óssea somente para casos negativos ao PET-CT ou para paciente que apresentem citopenias. O objetivo desta avaliação é determinar a localização e a extensão da doença.

Para os Linfomas de Hodgkin, o estadiamento sempre foi realizado

usualmente pelo sistema Ann Arbor (CARBONE et al. 1971), que foi posteriormente modificado no encontro de Costwolds (LISTER et al. 1989) e atualizado pela classificação de Lugano (CHESON et al. 2014). Este sistema classifica os pacientes em 4 estádios, separando aqueles com doença limitada (estádios I e II) daqueles portadores de doença avançada (estádios III e IV). Os critérios deste estadiamento revisado estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** - Sistema de estadiamento revisado para linfomas nodais primários (classificação de Lugano).

<b>Estadio</b>	<b>Envolvimento</b>	<b>Status extranodal (E)</b>
Doença limitada		
I	Um linfonodo ou grupo linfonodal adjacente	Lesão extranodal única sem envolvimento nodal
II	Dois ou mais grupos linfonodais do mesmo lado do diafragma	Estadio nodal I ou II com extensão extranodal contígua
II bulky	Estadio II associado a doença bulky	-
Doença avançada		
III	Linfonodos dos dois lados do diafragma ou linfonodos acima do diafragma com comprometimento esplênico	-
IV	Envolvimento adicional extralinfático não contíguo	-

**Fonte:** Adaptado de CHESON et al. (2014).



#### 1.2.4 Tratamento

Após o diagnóstico, avaliação inicial e consequente estadiamento, estes fatores são levados em consideração para a escolha terapêutica mais apropriada para cada caso. Os esquemas mais utilizados envolvem combinações de quimioterápicos, acompanhados ou não de radioterapia. O esquema mais empregado é conhecido pela sigla ABVD, uma combinação constituída por Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina. O outro esquema que pode ser empregado tem como acrônimo BEACOPP, composto pela utilização de Bleomicina, Etoposídeo, Adriamicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina e Prednisona. De uma forma geral e simplificada, este último é utilizado para pacientes com doença avançada e/ou características desfavoráveis.

Nos últimos anos, novas terapias foram incorporadas ao arsenal de tratamento do Linfoma de Hodgkin, particularmente nas situações de doença refratária ou recorrente. Alguns exemplos dessas drogas são: o Brentuximab vedotin, um anticorpo anti-CD30 conjugado a uma molécula citotóxica anti-mitótica, aprovada também para estádios III e IV em associação com quimioterapia; o Pembrolizumab e o Nivolumab, imunoterápicos que consistem em anticorpos monoclonais anti-PD1, uma molécula envolvida na inativação das células efectoras do sistema imunológico (ANSELL et al. 2015; ARMAND et al. 2016; CONNORS et al. 2018; NCCN 2019).

### 1.3 ASSOCIAÇÃO DO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR COM O LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

Como pode ser observado nos parágrafos anteriores, apesar das variações na frequência de sua positividade, todos os subtipos clínico-patológicos de Linfoma de Hodgkin clássico possuem algum grau de associação com o EBV. Esta relação pode ser utilizada tanto do ponto de vista auxiliar ao diagnóstico, nos casos positivos, como em tentar elucidar o nosso entendimento da oncogênese desta neoplasia.

O EBV, membro da família Herpes, foi inicialmente descoberto pela sua associação com Linfoma de Burkitt endêmico na África subsaariana, posteriormente sendo verificado que ele está presente de forma assintomática na maioria (cerca de 90%) da população adulta do mundo. Atualmente, sabe-se que o EBV está associado com a mononucleose infecciosa e uma série de neoplasias linfoproliferativas, como o Linfoma de células T e NK tipo nasal, um subgrupo de Linfomas difusos de grandes células B e o LHC (VOCKERODT et al. 2015), além de neoplasias não hematológicas, como os carcinomas indiferenciados da nasofaringe e alguns carcinomas gástricos (Cancer Genome Atlas Research Network 2014; WESTRA e LEWIS 2017).

O genoma do EBV codifica dois pequenos RNAs não codificantes conhecidos como EBER1 e EBER2 (EBV-*encoded* RNA), que são os transcritos virais mais abundantes em células infectadas (IWAKIRI 2014). Um dos principais mecanismos oncogênicos dos casos de LHC EBV-

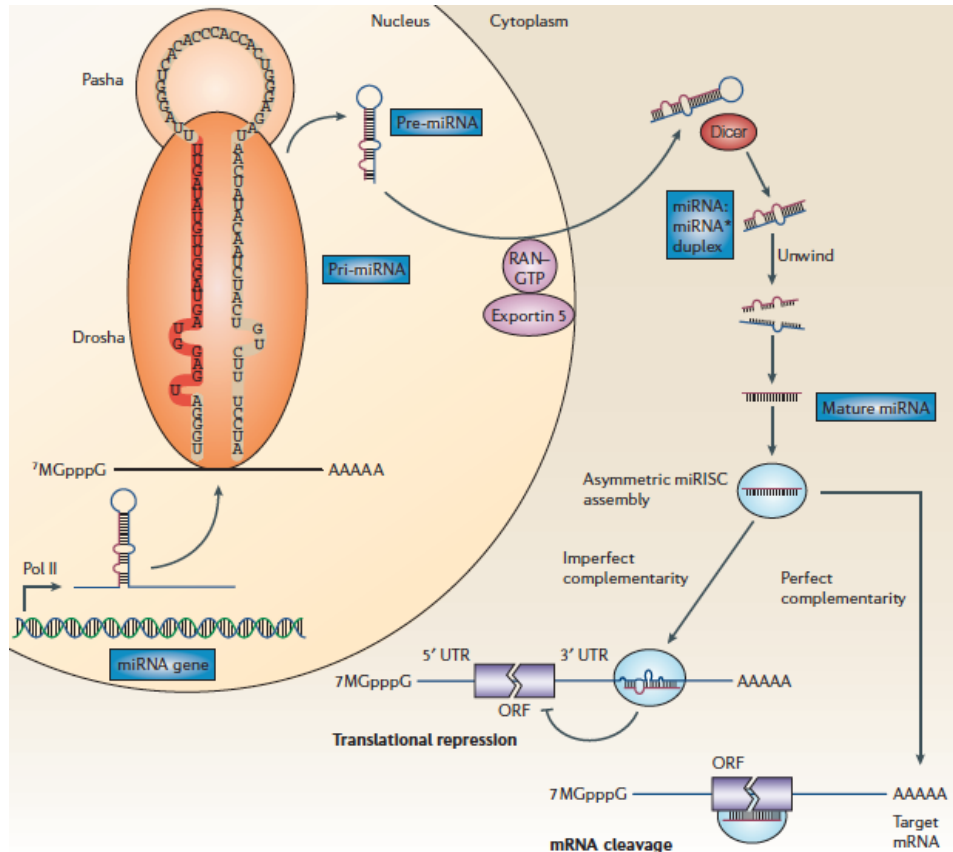
positivos é a indução da sobrevivência ao mecanismo de apoptose nas células infectadas. Existem duas proteínas latentes de membrana (*latent membrane protein* - LMP) que são cruciais para este efeito antiapoptótico, LMP-1 e LMP-2A, que são comumente expressas em células HRS EBV-positivas. LMP-1 induz sinalização celular de sobrevivência e diferenciação, com ação semelhante ao receptor CD40 ativado. Ela ativa diversas vias de sobrevivência celular, como as vias NF- $\kappa$ B, JAK-STAT e PI3K/AKT, vias que são constitutivamente ativas em LHC. LMP2A, por sua vez, simula o sinal ativado do receptor de células B (B-cell receptor - BCR), mesmo na ausência de um BCR funcional, fato que ocorre nas células progenitoras das células HRS (VOCKERODT et al. 2014).

#### **1.4 MICRORNAS ASSOCIADOS AO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO**

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA não codificante, que possuem cerca de 22 nucleotídeos. Elas são capazes de regular negativamente a expressão gênica no nível pós-transcricional, alvejando a região 3' não traduzida de um RNA mensageiro (RNAm). Há 2 mecanismos principais de atuação. Quando a complementariedade é perfeita ou quase perfeito com o alvo, o resultado é a degradação do RNAm e não formação da proteína. O segundo mecanismo, mais comum nas espécies animais, não envolve a degradação do RNAm, mas através de uma ligação imperfeita nos sítios 3' não traduzidos, reduzem a síntese proteica

dos seus genes alvo. Neste cenário, a expressão proteica é severamente diminuída, sem que haja redução dos níveis de RNAm (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006).

Em sua biogênese, os microRNAs são a princípio transcritos a partir de um dos genes codificantes de microRNA pela RNA polimerase II, formando um grande precursor de microRNA chamado pri-miRNA. Este é processado no núcleo das células pelas enzimas Pasha e Drosha, dando origem a moléculas contendo cerca de 70 nucleotídeos, chamadas pré-miRNAs. Os pré-miRNAs formam uma estrutura denominada *stem-loop*, que é exportada para o citoplasma da célula pelo complexo RAN-GTP e Exportin-5, para ser clivada pela enzima RNase III DICER, que então retira do *stem-loop* uma molécula de cerca de 22 nucleotídeos, que é composta por um pequeno duplex de microRNA, identificado como miRNA:miRNA\*. Para se tornar funcional, o microRNA maduro incorpora-se ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde ocorrerá a interação do microRNA com seu RNAm alvo. O microRNA complementar (microRNA\*) é rapidamente degradado (Figura 5) (ESQUELA-KERSCHER e SLACK 2006).



Fonte: Retirado de ESQUELA-KERSCHER e SLACK (2006).

**Figura 5** - Biogênese e mecanismo de ação dos microRNAs. Após a transcrição em grandes moléculas de RNA (pri-miRNA), as enzimas Pasha e Drosha dão origem aos pré-miRNA com a forma de *stem-loop*. Estes são exportados para o citoplasma da célula e clivados pela enzima DICER no duplex miRNA:miRNA\*. O miRNA maduro se incorpora ao RISC, enquanto que a cadeia complementar (miRNA\* é degradada). Caso a complementariedade seja perfeita com o alvo, há a degradação do RNAm; nos casos onde esta é imperfeita, ocorre a repressão da tradução das proteínas sem degradação do RNAm.

Em relação ao Linfoma de Hodgkin clássico, atualmente sabe-se que o EBV codifica pelo menos 25 pré-miRNAs e 44 miRNAs maduros, particularmente BART (*BamHI A rightward transcripts*) microRNAs, com variáveis alvos moleculares, como por exemplo CXCL11, sobre o qual exerce modulação imune e a própria LMP2A, onde provavelmente auxilia no mecanismo de evasão do sistema imunológico (GRUNDHOFF e SULLIVAN 2011; KLINKE et al. 2014). Além daqueles associados ao EBV, outros microRNAs já foram descritos em LHC, tanto com estudos realizados a partir de células em meio de cultura ou utilizando a massa tumoral total do tecido fixado em formalina e processado em parafina, dada a dificuldade da microdissecção da células HRS isoladamente, separando-a do fundo inflamatório misto (NAVARRO et al. 2008, 2009; NIE et al. 2008; GIBCUS et al. 2009; HUANG et al. 2012; SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN et al. 2013; DHIAB et al. 2015; CORDEIRO et al. 2017).

NAVARRO et al. (2008) avaliaram 156 microRNAs em 49 linfonodos exibindo LHC, comparando-os com 10 linfonodos reativos. Os autores encontraram um assinatura de 25 microRNAs diferencialmente expressos, sendo capazes de distinguir os LHC esclerose nodular dos LHC celularidade mista e dos linfonodos reativos. Além disso, também foi identificado que casos associados à infecção pelo EBV tem um perfil distinto daqueles EBV-negativos.

VLIERBERGHE et al. (2009) estudaram 360 microRNAs a partir de células HRS microdissecadas, provenientes de 9 pacientes com LHC e 4 linhagens celulares. Neste estudo, foi encontrada uma assinatura de 15

microRNAs diferencialmente expressos, sendo 12 hiper-regulados e 3 hiporregulados.

GIBCUS et al. (2009) analisaram 183 microRNAs em 4 linhagens celulares de LHC, utilizando como comparação linhagens celulares de outros linfomas de células B. Este experimento demonstrou um conjunto de 23 microRNAs diferencialmente expressos nas linhagens de LHC.

SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN et al. (2013), por sua vez, avaliaram a expressão de 723 microRNAs humanos e 76 virais, estudando 29 pacientes com LHC avançado e 5 linhagens celulares. Foram encontrados 100 microRNAs hiper-regulados nas amostras tumorais e 134 nas linhagens celulares.

JONES et al. (2014), analisando mais de 1000 microRNAs, entre 14 amostras de tecido contendo LHC e 8 linfonodos benignos, foram capazes de detectar a hiperexpressão de 238 microRNAs nos casos de LHC, bem como a presença de níveis elevados de miR-21 no plasma dos pacientes.

Em um dos estudos mais recentes, de PAYDAS et al. (2016), 32 amostras de tecido contendo LHC e 60 linfonodos reativos foram avaliados quanto à expressão de 377 microRNAs. Este estudo encontrou 11 microRNAs hiper-regulados e 13 hiporregulados nos LHC, associando o miR-889 com a presença de sintomas B e o miR-127-3p com o subtipo esclerose nodular.

Estes estudos demonstram uma grande variabilidade na quantidade e tipos de microRNAs descritos em associação com LHC. Esta discrepância pode ser explicada como decorrente dos diferentes tipos de amostra utilizados, bem como na diferença entre as plataformas e análises

estatísticas empregadas. É interessante que há diferenças mesmo entre células microdissecadas a partir de tecidos e linhagens celulares, inferindo que o microambiente pode ter um papel importante na regulação da expressão destas moléculas (CORDEIRO et al. 2017).

## **1.5 LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO – PROGNÓSTICO E BIOMARCADORES**

A sobrevida livre de recorrência e global de casos de LHC é considerada alta, girando em torno de 80% a 90% na maioria das séries. O maior desafio atual neste linfoma é identificar marcadores biológicos que sejam capazes de prever quais pacientes estarão no grupo dos doentes que experimentará recidiva, progressão e/ou óbito, eventos que geralmente estão associadas à resistência e/ou refratariedade ao esquema mais comum de quimioterapia empregado, o ABVD. No sentido da busca por biomarcadores preditores de agressividade biológica, devem ser pesquisadas não somente as alterações genéticas, mas também as epigenéticas. Neste contexto, o estudo dos microRNAs tem demonstrado um papel importante e inovador (SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN et al. 2013).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil de expressão microRNAs de Linfomas de Hodgkin clássico a partir de tecido incluído em blocos de parafina, comparando casos considerados livres de doença após a terapia instituída com casos que apresentaram recidiva da doença.



## **2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA**

O Linfoma de Hodgkin clássico (LHC) é uma das neoplasias linfoides mais frequentes do mundo. Apesar de bastante estudada, alguns aspectos fisiopatológicos ainda não estão completamente elucidados e as taxas de sobrevida global em 5 anos são da ordem de 85-90%. Entender melhor os mecanismos oncogênicos desta doença, incluindo o papel do EBV na iniciação da proliferação celular e sua progressão, pode contribuir no refinamento da escolha das modalidades terapêuticas, predizer resposta às terapias empregadas, estimar o prognóstico dos pacientes e fortuitamente descobrir possíveis alvos moleculares para futuras terapêuticas direcionadas e personalizadas. O perfil de microRNA do LHC ainda tem sido pouco estudado e a literatura ainda demonstra resultados conflitantes e sem associação bem estabelecida com dados preditivos às terapias alvo e fatores prognósticos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer e comparar o perfil de expressão de microRNAs de casos de Linfoma de Hodgkin clássico, entre casos sem evidência de doença após tratamento e aqueles que apresentaram recidiva, utilizando como referência casos de linfonodos reativos exibindo processos hiperplásicos com predomínio de expansão do compartimento de células B (hiperplasia folicular) ou com expansão predominante do compartimento de células T (hiperplasia paracortical).

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Descrever as características clínicas e laboratoriais dos casos de Linfoma de Hodgkin clássico diagnosticados no período do estudo no A.C.Camargo Cancer Center.

Descrever as características patológicas, incluindo subtipo histológico, expressão de marcadores imuno-histoquímicos e prevalência da positividade para o vírus de Epstein-Barr dos casos com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico.

Estabelecer e comparar o perfil de expressão de microRNAs de alguns casos de Linfoma de Hodgkin clássico, entre pacientes livres do linfoma após emprego de terapia citotóxica e pacientes com recidivas.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

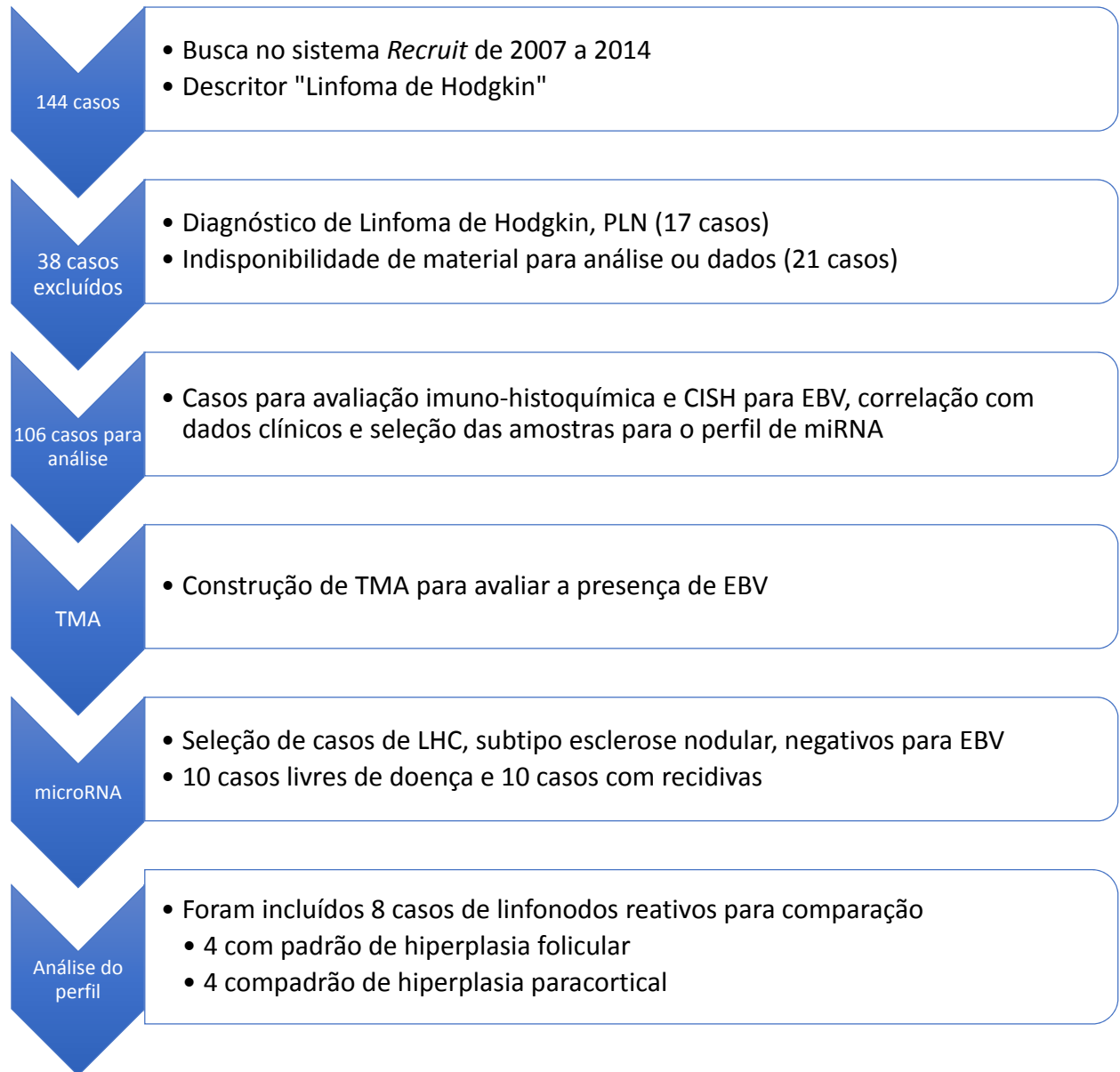
### **4.1 VISÃO GERAL DO PROJETO E ASPECTOS ÉTICOS**

O presente projeto trata-se de um estudo retrospectivo, baseado na avaliação de amostras e obtenção de material para análise molecular a partir de tecidos humanos de pacientes diagnosticados com Linfoma de Hodgkin clássico, fixados em formalina e processados em parafina. Este estudo foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, sob o certificado de apresentação para apreciação ética (CAAE) número 88193818.6.0000.5432 e aprovado através do parecer número 2.679.026 (Anexo 1)

### **4.2 CASUÍSTICA**

Após busca através do sistema *Recruit* com o descritor “Linfoma de Hodgkin”, foram recuperados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, lâminas e blocos de parafina contendo material neoplásico de pacientes submetidos à biópsia excisional de linfonodo ou biópsia incisional de tumoração, realizadas no A.C.Camargo Cancer Center, no período de 2007 a 2014. Cada caso foi revisto por um hematopatologista para confirmação diagnóstica, subclassificação e seleção dos blocos de parafina a serem utilizados.

Foram incluídos os casos com confirmação do diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico, disponibilidade dos blocos de parafina e representação tumoral apropriada. Foi criado um banco de dados destes pacientes, contendo informações relacionadas a dados demográficos, antecedentes mórbidos, tipo de tratamento e terapias prévias, achados dos exames laboratoriais, presença de recidiva ou progressão da doença, complicações do tratamento e dados do seguimento de todos os pacientes. A Figura 6 demonstra o plano de trabalho deste projeto, desde a seleção das amostras até a análise dos perfis de microRNAs.



**Figura 6** - Fluxograma de seleção das amostras e plano de trabalho do projeto.

### **4.3 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA**

As lâminas originais de imuno-histoquímica confeccionadas para o estabelecimento do diagnóstico foram revistas, visando a avaliação dos marcadores CD30, CD20, CD15 e CD3. Estes anticorpos foram avaliados tanto quanto em relação à presença de sua expressão nas células neoplásicas (HRS) como na porcentagem de células inflamatórias (linfócitos B, granulócitos e linfócitos T) presentes no microambiente tumoral. A análise nas células neoplásicas foi avaliada de forma binária, como positivo ou negativo; a avaliação das células do microambiente foi analisada como uma porcentagem do total de células presentes no campo mais representativo da neoplasia, aquele com a maior quantidade de células positivas (*hot spot*). Os casos que não possuíam as lâminas disponíveis no momento da análise ou cuja reação não apresentava controles internos adequados foram considerados como não avaliáveis.

### **4.4 CONFECÇÃO DE TISSUE MICROARRAY (TMA) PARA AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR**

Para a construção do TMA foi selecionada, de cada amostra, uma área representativa, preferencialmente sem necrose, fibrose extensa ou calcificação, sendo marcada no bloco de parafina e lâmina histológica. Posteriormente, utilizou-se o Beecher MT1 *manual arrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, *Silver Spring, Maryland*, Estados Unidos da

América) para a confecção do TMA, tendo sido construída uma matriz com duas amostras de tumor medindo aproximadamente 1,0 mm de diâmetro cada.

#### 4.5 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU CROMOGÊNICA (CISH) PARA EBV

Para avaliar a presença do EBV, foi realizada hibridização *in situ* para o RNA do vírus (EBV-*encoded* RNA probe - EBER, Novocastra), utilizando um hibridizador automatizado DAKO. Foi realizado um corte histológico com 4 µm de espessura do bloco de TMA, posteriormente montado em lâmina silanizada. As amostras preparadas em lâmina de vidro foram inicialmente desparafinizadas em xilol e etanol. A seguir, foi usada solução com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após lavagem, foram aplicadas 1 a 2 gotas de Solução de Pepsina (ES1) por 3 minutos a 37°C em câmara úmida para o processo de desproteínização. A seguir, foi aplicado 10 µL da sonda sobre cada amostra, que foi coberta com lamínula e selada com o selante. A lâmina foi incubada por 5 minutos a 75°C no hibridizador para o processo de desnaturação de ácidos nucleicos celulares indesejados e hibridizada por 90 minutos a 55°C. Após a hibridização, a lâmina foi lavada e, a seguir, aplicou-se 25µL do anticorpo monoclonal *Mouse anti DIG* (AB1). Foi coberta com lamínula e incubada por 60 minutos a 37°C na câmara úmida. Após nova lavagem, aplicou-se 25 µL do anticorpo monoclonal *Anti Mouse HRP Polymer* (AB2), cobrindo com lamínula. Procedeu-se a outra incubação por 30 minutos a 37°C na câmara úmida, com posterior lavagem.

Para a revelação com cromógeno, foi aplicado 50 µL do *DAB Solution*, com incubação posterior de 15 minutos a 37°C. A seguir, a lâmina foi contra-corada com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. A positividade foi demonstrada pela coloração nuclear marrom-dourado visualizada em microscópio óptico. Casos foram considerados positivos se exibiram marcação nuclear forte nas células neoplásicas e negativos quando houve ausência de marcação.

#### **4.6 SELEÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE RNA**

Após a avaliação morfológica, imuno-histoquímica e hibridização *in situ*, foram selecionados 20 casos de linfoma de Hodgkin clássico, subtipo esclerose nodular, negativos para a presença do EBV, sendo 10 deles livres de doença e 10 casos que apresentaram recidiva. Foram escolhidas as amostras provenientes de ressecção cirúrgica e com a maior quantidade tecido neoplásico disponível. Adicionalmente, para este ensaio, foram também incluídos, a partir do arquivo de casos do Departamento de Anatomia Patológica, 4 amostras de linfonodos reativos com padrão de hiperplasia folicular e 4 amostras de linfonodos reativos com padrão de hiperplasia paracortical, para serem utilizados como controles das reações. De todos estes casos foram realizados 5 cortes de 10µm a partir de cada bloco de parafina, tendo sido colocados diretamente em microtubos (tubos de *ependorf*) para a realização de extração de RNA total, segundo protocolo do setor de diagnóstico molecular do A.C.Camargo Cancer Center.



## 4.7 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para a extração do RNA total foi utilizado o Kit de extração *Recover All* (Ambion®), de acordo com as recomendações do fabricante: foi adicionado 1,0 mL de xilol em cada tubo contendo o material seccionado a partir dos blocos de parafina dos casos. As amostras foram submetidas ao vórtex, centrifugadas e em seguida incubadas por 3 minutos a 50°C sob agitação. Após centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e adicionado 1,0 mL de etanol à 100% ao tubo contendo o pellet. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet secado em centrífuga à vácuo (CENTROVAC) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após a secagem do pellet, foi adicionado 100,0 µL do tampão Digestion buffer e 4,0 µL de protease; as amostras foram incubadas por 15 minutos a 50°C e em seguida por 15 minutos a 80°C. Posteriormente foi adicionada a solução aditiva/etanol, sendo utilizados tubos de 1,5mL contendo uma coluna de sílica inserida, passando o sobrenadante do tubo primário para o secundário, centrifugando a 10.000 rpm por 30 segundos. Após 2 lavagens com tampão Wash1 e Wash2, foi realizado um tratamento com DNase por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, é realizada mais uma sequência de lavagens com Wash1 e Wash2, submetendo-os à centrifugação. As colunas foram então transferidas para outros tubos e foi adicionado 20,0 µL de água livre de nuclease, deixando em temperatura ambiente por um minuto, depois centrifugando por mais 30 segundos na velocidade máxima

(14000 rpm). A concentração e a pureza do RNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). As amostras de RNA foram armazenadas em freezer à -80°C.

## **4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS miRNAs**

### **4.8.1 Síntese do cDNA**

A reação de síntese do cDNA foi feita em um volume final de 7,5 µl contendo 300 ng de RNA total, 0,8 µl de RT Buffer, 0,2 µl de dNTP Mix (100 mM), 0,8µl de Megaplex RT Primer 1,5 µl da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase, 0,1 µl de inibidor de RNase. A reação foi incubada em 40 ciclos de 16 °C por 2 minutos, 42°C por 1 minuto e 50 °C por 1 segundo, seguido por incubação a 85 °C por 5 minutos. Após o término da síntese, as amostras foram armazenadas em freezer à -20°C.

A seguir foi realizada uma etapa de pré-amplificação do cDNA em volume final de 25,0 µl contendo 12,5 µl do tampão TaqMan PreAmp Master Mix (2X) 2,5 µl de Megaplex PreAmp Primers (10X), 7,5 µl de água livre de DNase/RNase e 2,5 µl do produto da síntese de cDNA. A reação foi incubada a 95 °C por 10 minutos, 55°C por 2 minutos e 72 °C por 2 minutos. Em seguida foi realizada uma incubação em 12 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos, por incubação a 99,9 °C por 10 minutos. Após o término da pré-amplificação, as amostras foram armazenadas em freezer à -20°C.

#### 4.8.2 Amplificação do cDNA e Análise da Expressão de microRNAs

A análise da expressão de miRNAs foi realizada utilizando-se a placa TaqMan Low Density Array. Cada array contém 377 miRNAs e miRNAs de controle. O ensaio de amplificação foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados no manual do kit Megaplex Primer Pools for microRNA Expression Analysis, conforme descrição a seguir: a reação foi feita em um volume final de 900,0 µl contendo 9,0 µl de cDNA pré-amplificado, 450,0 µl do TaqMan Universal Master Mix (2X) (contendo MgCl<sub>2</sub>, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (AmpliTaqGold)) e 441,0 µl de água livre de DNase/RNase. A amplificação foi feita em 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, precedidos por um período de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos. A amplificação foi realizada no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) foram obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começou a ser detectado. O nível de expressão dos miRNAs foi quantificado relativamente à expressão do microRNA let-7d e também normalizado de acordo com uma amostra calibradora (pool de 4 amostras de linfonodos reativos). O resultado final foi expresso como um aumento ou diminuição da expressão de um miRNA em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma:  $n \text{ miRNA} = 2^{-(\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador})}$ , onde  $\Delta Ct$  da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-

se o valor médio de Ct do miRNA estudado do valor médio de Ct do microRNA usado como controle.

#### **4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para realização da análise estatística da correlação dos dados imunohistoquímicos com dados clínicos e laboratoriais foi utilizado o *software* SPSS. Para análise de dados não-paramétricos dicotômicos foram utilizados os testes de qui-quadrado e o de probabilidades exato de Fisher. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05. A diferença entre medianas foi calculada pelo teste Mann-Whitney. As análises das sobrevidas global e livre de eventos foi realizada utilizando o método de Kaplan-Meier e o teste log-rank. Para o cálculo da sobrevida global foi considerada a partir da data do diagnóstico na biópsia até a data do óbito ou, para os que estavam vivos, a data do fechamento do seguimento clínico, que foi janeiro de 2017. Para o cálculo da sobrevida livre de eventos foi considerado o período da data da biópsia até a documentação de uma recidiva (através de exame clínico, exames de imagem ou realização de uma nova biópsia) ou data do óbito. Para análise multivariada, foi empregado o modelo de regressão de Cox.

Para a análise e comparação dos perfis de microRNA, a primeira etapa considerou os dados normalizados, onde as amostras foram agrupadas nas classes de linfonodo reativo com hiperplasia folicular (HF), linfonodo reativo com hiperplasia paracortical (HP), Linfoma de Hodgkin

clássico sem evidência de doença e Linfoma de Hodgkin clássico recidivado. Em seguida, foi feita uma análise de expressão diferencial entre os grupos pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis. Os miRNAs diferencialmente expressos em cada análise foram utilizados para a realização de agrupamento hierárquico não supervisionado. Todas as etapas foram realizadas no ambiente R (<https://www.r-project.org/>).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA – ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS**

O material de cento e quarenta e quatro pacientes com o diagnóstico de Linfoma de Hodgkin foi recuperado do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center com base no critério de inclusão. Após revisão histopatológica e dos dados disponíveis, foram excluídos da análise os casos com o diagnóstico de Linfoma de Hodgkin, predominância linfocitária nodular (17 casos), ou que não dispunham de todas as informações clínicas, histopatológicas e/ou imuno-histoquímicas para avaliação (21 casos), o que resultou na exclusão de 38 casos com material e/ou dados inadequados.

Dos 106 casos com dados completos para análise, 51,9% eram do sexo feminino e 48,1% do sexo masculino. A média de idade dos pacientes foi de 38,3 anos, com intervalo entre 17 e 82 anos e mediana de 33,5 anos. Dentre alguns parâmetros laboratoriais relevantes, os níveis séricos de albumina dos pacientes variaram entre 2,4 e 4,8 g/dL, com mediana de 4,1 g/dL e média de 4,0 g/dL. A quantificação da desidrogenase láctica (DHL) variou entre 120 e 877 U/L, com mediana de 219,6 U/L e média de 256,1 U/L.

Trinta e quatro pacientes (32% do total) apresentaram conglomerados

linfonodais medindo 7,5 cm ou mais (classificados como portadores de doença *bulky*). Somente 8,5% dos pacientes exibiam comprometimento da medula óssea ao diagnóstico. Em relação ao estadiamento clínico de Ann Arbor revisado pela classificação de Lugano 10,4% dos casos foram diagnosticados em estágio I, 49,1% apresentavam-se em estágio II 20,8% em estágio III e 19,7% em estágio IV. A grande maioria dos pacientes foi tratada com o esquema ABVD, uma sigla que representa a combinação de Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina (96,2%), com apenas 4 pacientes tendo sido submetidos a outros esquemas de quimioterapia. Destes últimos, 3 deles receberam o esquema BEACOPP (composto pela utilização de Bleomicina, Etoposídeo, Adriamicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina e Prednisona) e 1 paciente foi submetido à combinação COPP/ABV (Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina e Prednisona/ Adriamicina, Bleomicina e Vinblastina). Mais da metade dos pacientes (50,9%) também foi submetido à radioterapia.

A maior parte dos pacientes (85,6%) teve resposta completa (RC) após a terapia empregada. Somente 2,1% exibiram resposta parcial (RP), enquanto que 12,3% apresentaram progressão da doença (PD) ao final do tratamento de primeira linha. Os dados clínicos e laboratoriais encontram-se sumarizados na Tabela 3.

**Tabela 3** - Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico.

Variáveis	Categorias	Frequência (%)	Variação	Média	Mediana
Sexo	Masculino	51,9	-	-	-
	Feminino	48,1			
Idade (anos)	-	-	17 - 82	38,3	33,5
Albumina (g/dL)	-	-	2,4 – 4,8	4,0	4,1
DHL (U/L)	-	-	120 - 877	256,1	219,6
Doença <i>bulky</i>	Sim	32	-	-	-
	Não	68			
Comprometimento de medula óssea	Sim	8,5	-	-	-
	Não	91,5			
Estadiamento	I	10,4	-	-	-
	II	49,1			
	III	20,8			
	IV	19,7			
Terapia	ABVD	96,2	-	-	-
	Outros	3,8			
Resposta à terapia	RC	85,6	-	-	-
	RP	2,1			
	PD	12,3			
Seguimento (meses)	-	-	2 a 62	26	26

## 5.2 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA: ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS, IMUNO-HISTOQUÍMICOS E DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Os sítios preferenciais de biópsias foram a região cervical (65,9%), seguidos pelo mediastino (21,6%), região inguinal (5,1%) e axilar (3,1%). Outras topografias como retroperitônio, pelve e pulmão compreenderam



menos de 5% dos casos biopsiados.

A maioria dos casos cuja subclassificação histopatológica foi possível apresentou critérios diagnósticos do subtipo Esclerose Nodular (EN - 85,1%), seguido pelos padrões de Celularidade Mista (CM - 9,3%) e Rico em Linfócitos (RL - 5,6%). Não houve casos com morfologia de Depleção Linfocitária (DL) nesta casuística.

Quanto a avaliação da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos nas células de Hodgkin-Reed-Sternberg, todos os casos demonstraram expressão de membrana de CD30, frequentemente com reforço paranuclear na região do complexo de Golgi. Este dado foi avaliado para fins de confirmação diagnóstica, conjuntamente com os aspectos morfológicos e os outros marcadores analisados. No que tange a expressão de CD15 nas células HRS, 80,7% demonstraram alguma marcação de membrana, independente da quantidade e intensidade de células positivas. A expressão de CD20 foi encontrada em 19,4% dos casos, sempre de forma fraca e heterogênea, em geral marcando somente parte das células neoplásicas.

A avaliação do microambiente tumoral revelou uma variação na presença de linfócitos B CD20-positivos de 0 a 70% na composição do infiltrado inflamatório de fundo, com média de 24,1% e mediana de 20%. A quantificação de linfócitos T CD3-positivos oscilou entre 10 e 95%, com média de 66,4% e mediana de 70%. As células CD15-positivas presentes no microambiente foram observadas dentro do espectro de 0 a 90% de positividade, com média de 6,5% e mediana de 2%.

Em relação à frequência de positividade para o vírus de Epstein-Barr 12,3% dos casos com material disponível para avaliação no tissue microarray exibiram positividade nuclear para o vírus nas células neoplásicas. Estes casos compreenderam 10,9% dos casos de Linfoma de Hodgkin clássico, esclerose nodular e 60% dos casos de Linfoma de Hodgkin clássico, celularidade mista.

Os dados histopatológicos, imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ* encontram-se sumarizados na Tabela 4.

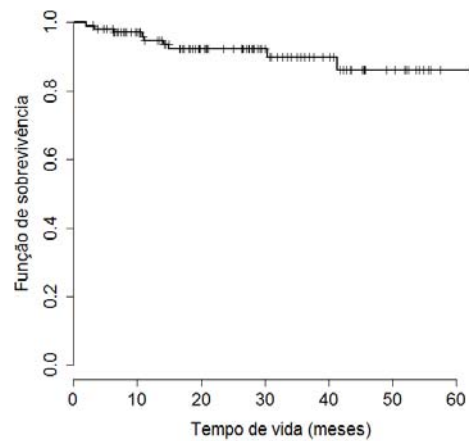
**Tabela 4** - Dados histopatológicos, imuno-histoquímicos e de hibridização *in situ* dos pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico.

Variáveis	Categorias	Frequência (%)	Variação	Média	Mediana
Sítio de biópsia	Cervical	65,9	-	-	-
	Mediastino	21,6			
	Inguinal	5,1			
	Axilar	3,1			
	Outros	4,3			
Subtipo histológico	EN	85,1	-	-	-
	CM	9,3			
	RL	5,6			
CD30 HRS	Positivo	100	-	-	-
	Negativo	0			
CD15 HRS	Positivo	80,7	-	-	-
	Negativo	19,3			
CD20 HRS	Positivo	19,4	-	-	-
	Negativo	81,6			
CD20 fundo (%)	-	-	0 a 70	24,1	20
CD3 fundo (%)	-	-	10 a 95	66,4	70
CD15 fundo (%)	-	-	0 a 90	6,5	2
CISH EBV	Positivo	12,3	-	-	-
	Negativo	87,7			

### **5.3 CORRELAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS COM DADOS DE SOBREVIDA**

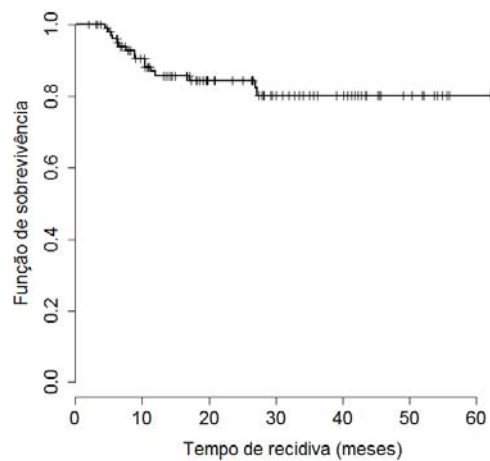
O tempo de seguimento médio e mediano dos pacientes foi de 26 meses, com intervalo entre 2 e 62 meses. A sobrevida global geral desta coorte foi de 92,1% em 60 meses (Figura 7). A sobrevida livre de progressão foi de 83,6% no mesmo período (Figura 8).

Dentre os parâmetros capazes de estratificar o risco de óbito pela doença, idade de 60 anos ou mais, níveis séricos de albumina de 3g/dL ou inferiores, níveis de desidrogenase láctica (DHL) maiores que 352 U/L, o estadiamento clínico de Ann Arbor, o emprego e outros esquemas de quimioterapia alternativos ao ABVD, a expressão de CD20 nas células neoplásicas e a presença de 2% ou menos de células CD15-positivas no microambiente tumoral foram variáveis que figuraram como associadas a pior sobrevida global na análise univariada, com valor p estatisticamente significativo (Figuras 9 a 15). Apesar de não ter atingido a significância estatística, casos cuja composição do infiltrado inflamatório de fundo apresentavam mais de 10% de células positivas para CD20 (linfócitos B), bem como aqueles com 80% ou menos de células CD3-positivas (linfócitos T), exibiram uma tendência a pior sobrevida global (Figuras 16 e 17, respectivamente).

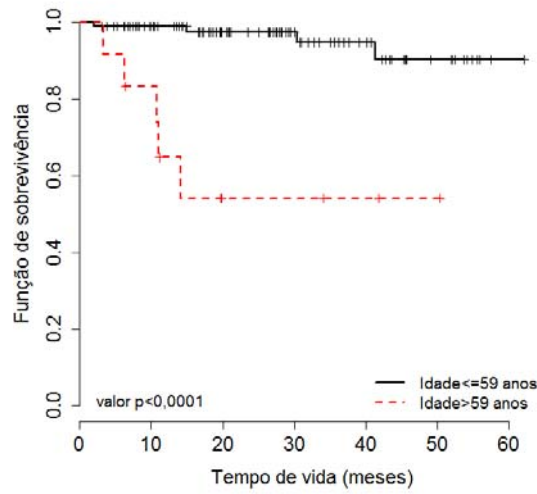


**Figura 7** - Curva de Kaplan-Meier demonstrando a sobrevida global geral dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico. Para a coorte como um todo, a sobrevida global foi de 92,1% em 5 anos.

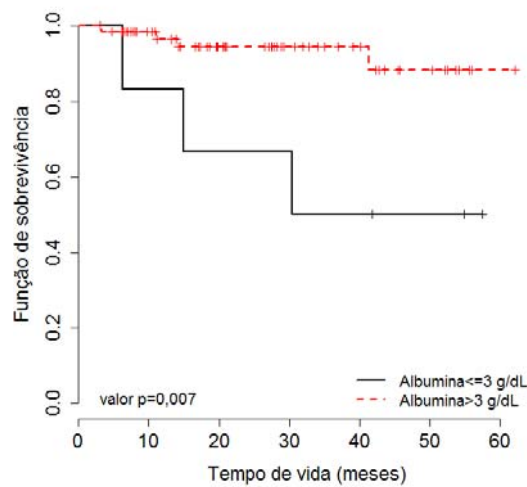
Em análise multivariada (modelo de regressão logística de *cox*), apenas a idade e os níveis séricos elevados de DHL mantiveram-se como fatores prognósticos relevantes em relação à sobrevida global.



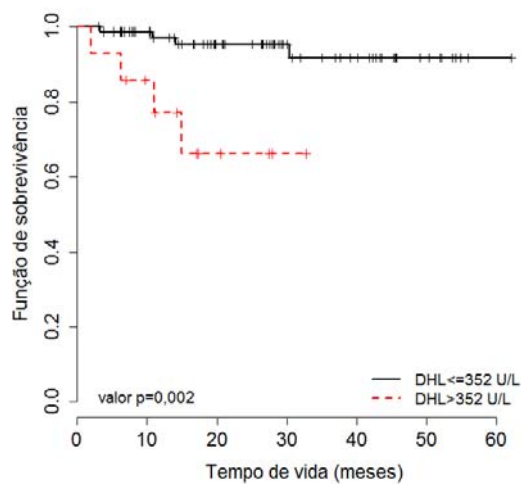
**Figura 8** - Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, que atingiu o valor de 83,6% aos 60 meses.



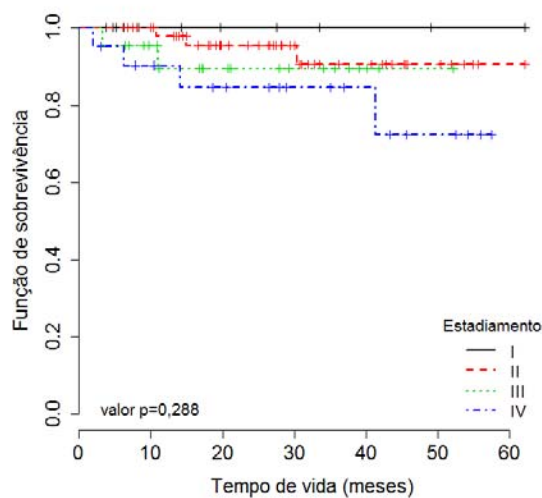
**Figura 9** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais, estratificada pela idade dos pacientes, se ao diagnóstico possuíam 59 anos ou menos ou mais de 59 anos.



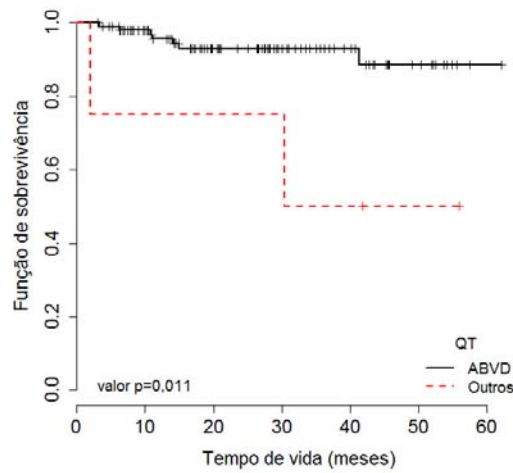
**Figura 10** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais. Aqui, demonstra-se a sobrevida global estratificada pelos níveis séricos de albumina.



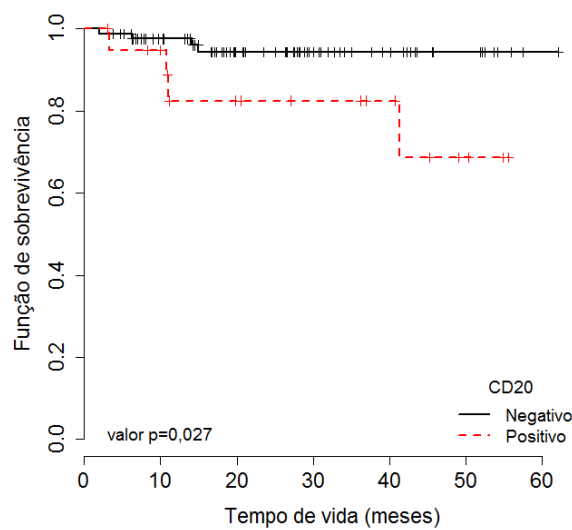
**Figura 11** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais, estratificada pelos níveis séricos de DHL, se menores ou iguais a 352 U/L ou maiores que 352 U/L.



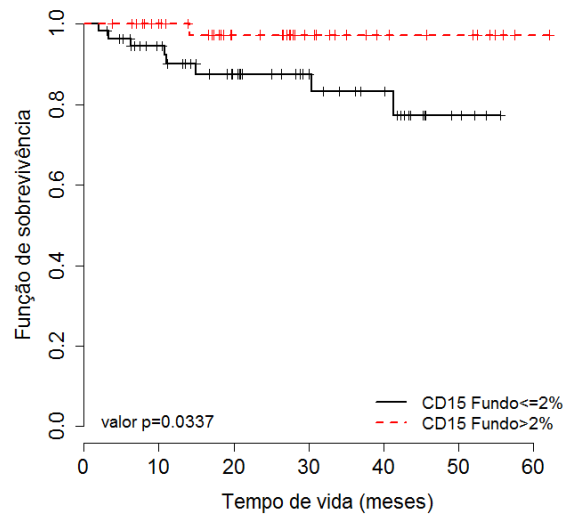
**Figura 12** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação a parâmetros clínico-laboratoriais, estratificada pelo estadiamento clínico de Ann Arbor.



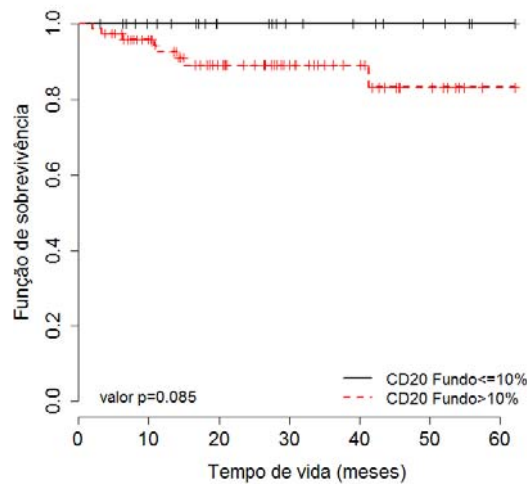
**Figura 13** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à terapia empregada. Pacientes que não receberam o esquema ABVD tiveram sobrevida inferior aos que foram tratados com este esquema.



**Figura 14** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica, estratificada pela presença de expressão de CD20 nas células HRS. A presença de expressão se correlacionou com pior evolução.

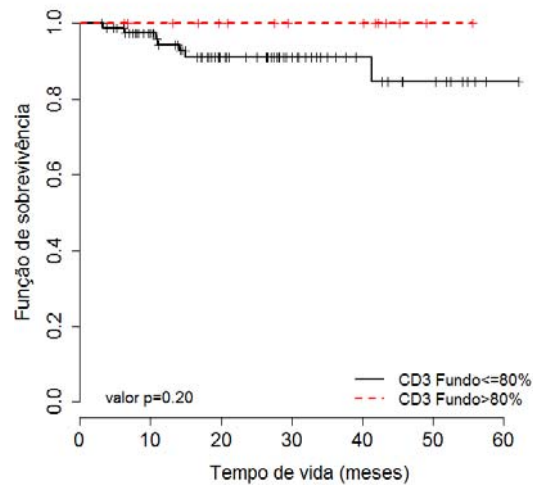


**Figura 15** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica. A presença de 2% ou menos de células CD15-positivas no microambiente tumoral correlacionou-se com sobrevida inferior.



**Figura 16** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica, estratificada pela porcentagem de linfócitos B CD20-positivos no microambiente tumoral. Casos com a presença de mais de 20% destas células demonstraram uma tendência a evolução menos favorável.

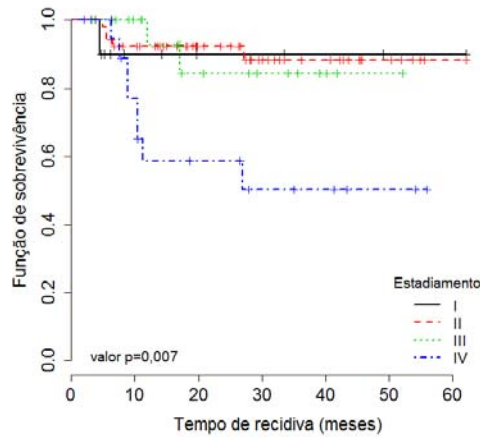




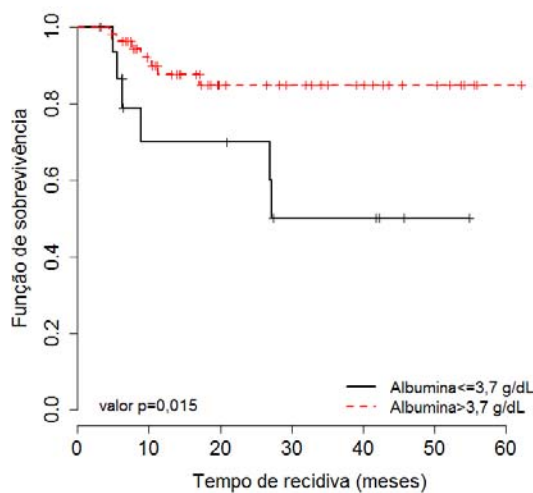
**Figura 17** - Curva de Kaplan-Meier de sobrevida global em relação à avaliação imuno-histoquímica, estratificada pela porcentagem de linfócitos T CD3-positivos no microambiente tumoral. Inversamente à avaliação do CD20, casos com mais de 80% destas células exibiram tendência a melhor prognóstico.

Em relação à sobrevida livre de progressão, os níveis séricos de albumina e o estadiamento foram fatores associados a pior evolução (Figuras 18 e 19). Outros parâmetros, apesar de não atingirem significância estatística, demonstraram uma tendência à separação das curvas de sobrevida, como por exemplo em relação à composição do microambiente tumoral. As Figuras 20 e 21 ilustram que casos que possuam uma composição do infiltrado inflamatório de fundo com menos linfócitos B (menos de 30% das células) e mais linfócitos T (mais de 55% do total) possuem tendência a maior probabilidade de recidiva. Da mesma maneira, casos que possuíam 20% ou menos de células CD15 positivas no estroma tumoral demonstraram uma tendência à pior evolução em relação à recorrência (Figura 22). A expressão de CD20 nas células neoplásicas de HRS demonstrou apenas uma discreta diferença nesta avaliação de

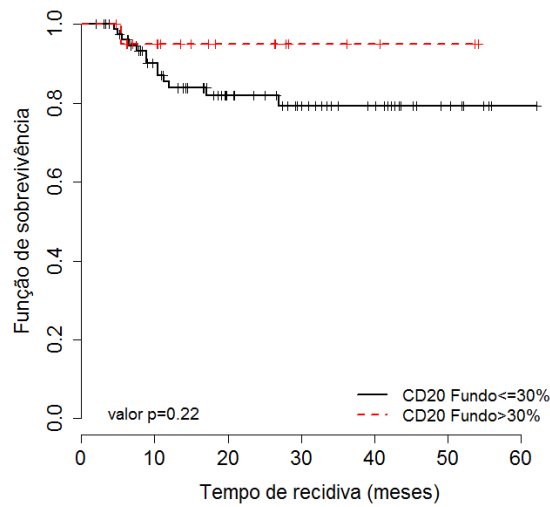
sobrevida, com leve tendência ao pior prognóstico para os casos positivos para CD20, em contraste ao resultado estatisticamente significativo observado na análise univariada para a sobrevida global (Figura 23).



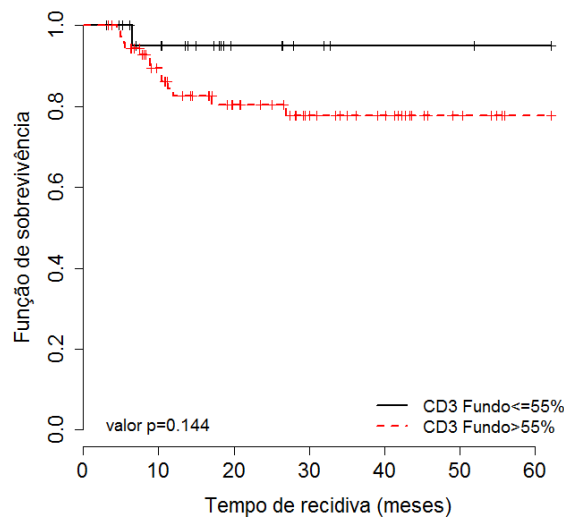
**Figura 18** - Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pelo estadiamento Ann Arbor.



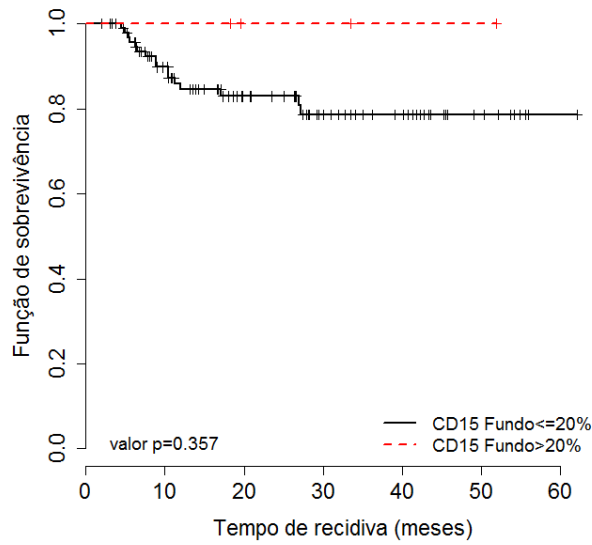
**Figura 19** - Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pelos níveis séricos de albumina.



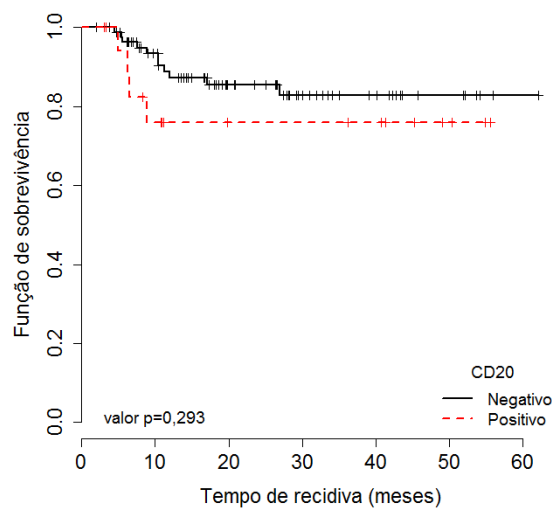
**Figura 20** - Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pela percentagem de células CD20-positivas no microambiente tumoral.



**Figura 21** - Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pela percentagem de células CD3-positivas no microambiente tumoral.



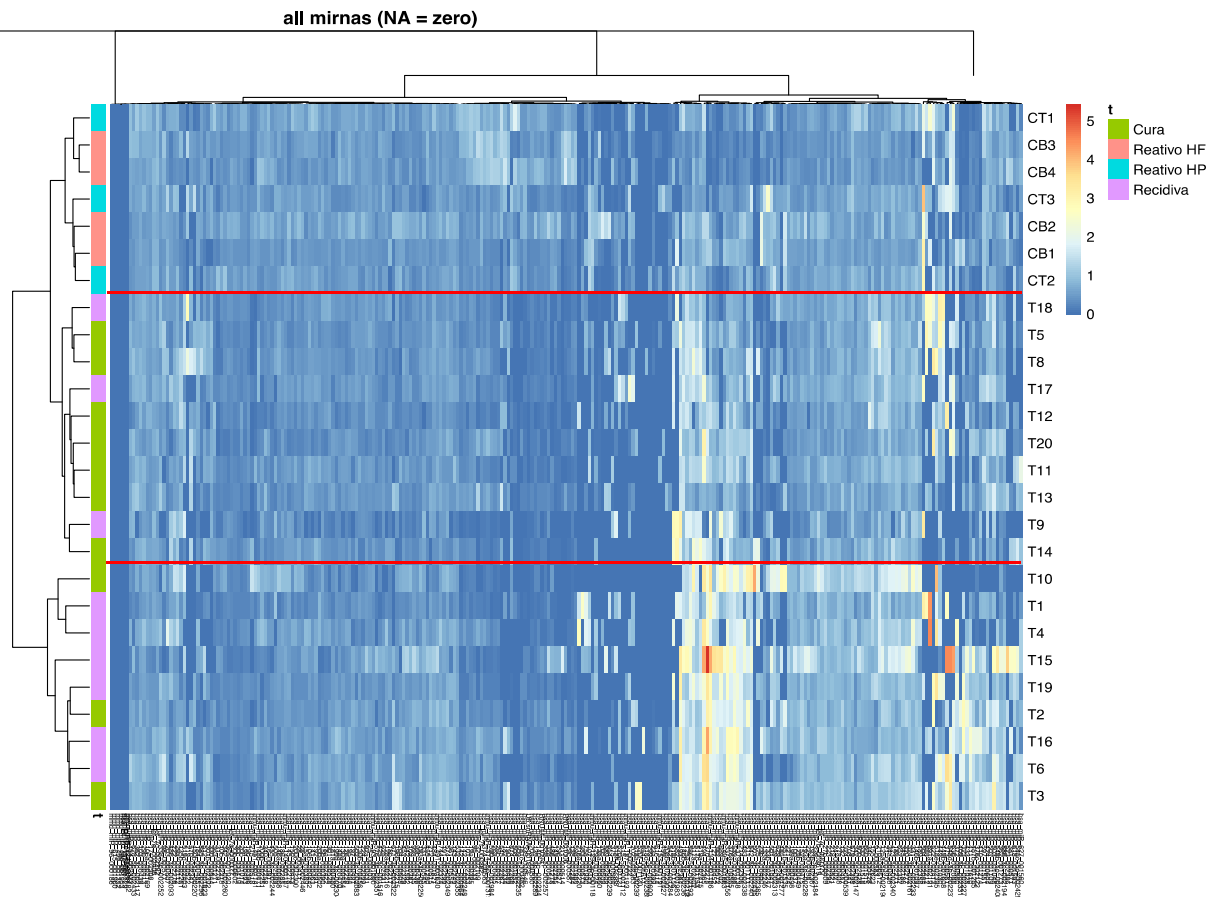
**Figura 22** - Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada pela porcentagem de células CD15-positivas no microambiente tumoral.



**Figura 23** - Curva de Kaplan-Meier exibindo a sobrevida livre de progressão dos pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico, estratificada quanto à presença ou ausência de expressão de CD20 nas células neoplásicas.

## 5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MICRORNAS

Dois dos casos submetidos a este ensaio não apresentaram RNA em quantidade e qualidade suficiente para amplificação dos microRNAs, tendo que ser excluídos da avaliação (um caso de Linfoma de Hodgkin clássico recidivado e um caso de linfonodo reativo com hiperplasia paracortical). A análise geral da expressão de microRNAs de todos os casos cujas reações funcionaram adequadamente permitiu o agrupamento com base em 3 perfis relativamente distintos, através do método de *unsupervised hierarchical clustering* (agrupamento hierárquico não supervisionado - Figura 24). Os casos de linfonodos reativos agruparam-se todos no mesmo *cluster*, independente se o padrão morfológico predominante era de hiperplasia folicular ou paracortical (terço superior da Figura 24). O segundo *cluster* compreendeu a maioria dos casos de Linfoma de Hodgkin clássico livres de doença (terço médio da Figura 24), enquanto que o terceiro *cluster* abrangeu a maioria dos casos de Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidivas (terço inferior da Figura 24). É interessante notar que o grupo que continha a maioria dos casos livres de doença agrupou-se mais próximo dos casos reativos do que o grupo que apresentou a maior parte das recidivas.



**Figura 24** - Heatmap da análise da expressão dos microRNAs para todos os casos de Linfomas de Hodgkin clássico e linfonodos reativos. Ao lado esquerdo encontram-se os casos agrupados pelo método de *unsupervised hierarchical clustering*, identificados por cores segundo a legenda à direita. Adjacente à legenda há a identificação de cada amostra para este ensaio, bem como a barra de cores que demonstra a intensidade de expressão. HF: hiperplasia folicular; HP: hiperplasia paracortical. Duas linhas vermelhas horizontais foram inseridas na figura para facilitar a identificação dos agrupamentos principais. No terço superior estão os casos de linfonodo reativo; no terço médio, a maioria dos casos é de Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença; no terço inferior, a maioria dos pacientes era portador de Linfoma de Hodgkin clássico e experimentou recidiva da neoplasia.

O único microRNA diferencialmente expresso de forma estatisticamente significativa entre os grupos de linfonodos reativos foi o miR-24, que esteve mais expresso no grupo com hiperplasia paracortical, com *fold change* de 0,42 (valor p igual a 0,049). Para os demais microRNAs avaliados, não houve diferença entre estes dois grupos (Tabela 5).

**Tabela 5** - Comparação de microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de linfonodos reativos, com padrão de hiperplasia folicular ou hiperplasia paracortical.

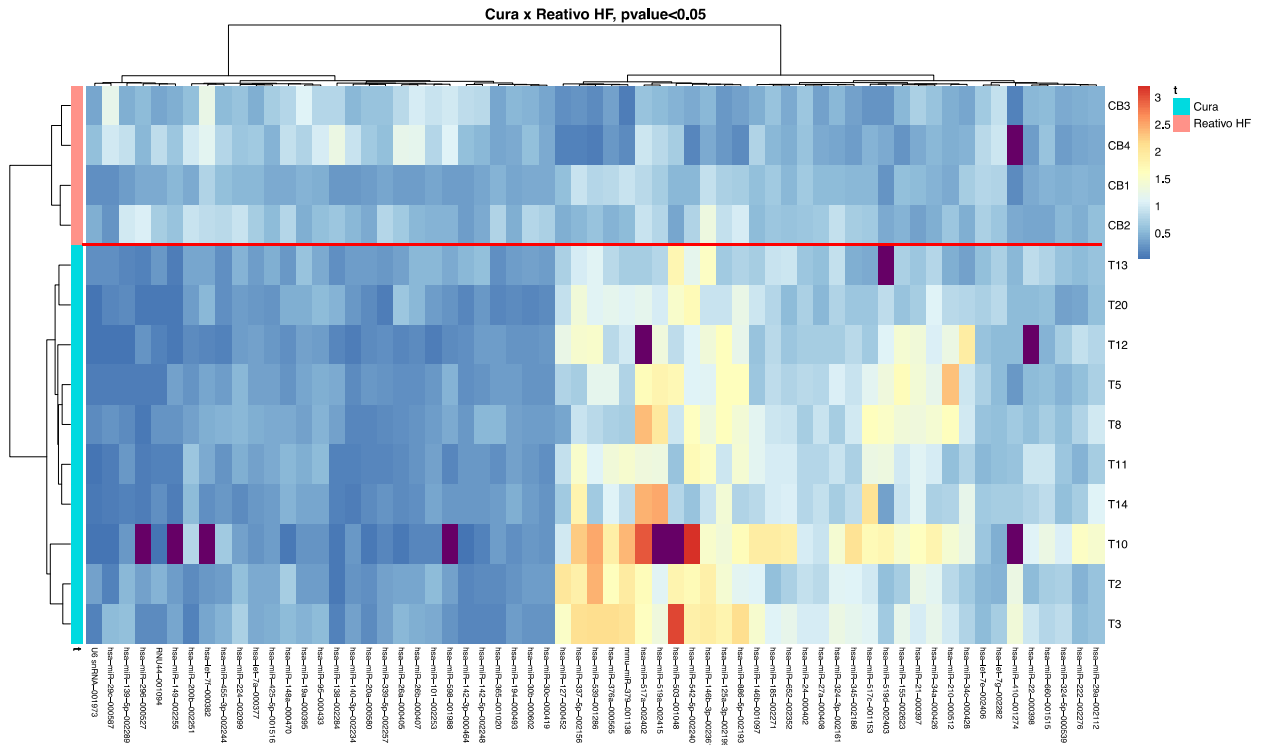
Hiperexpresso em HP		
miRNA	<i>Fold change</i>	Valor p
miR-24	0,42	0,049

Na comparação entre os casos de Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e linfonodos com hiperplasia folicular, houve 61 microRNAs diferencialmente expressos com significância estatística, possibilitando clara separação entre os grupos por meio do agrupamento não supervisionado. Todos os casos de LHC e HF agruparam-se entre si (Tabela 6 e Figura 25).

**Tabela 6** - Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e linfonodos reativos com hiperplasia folicular.

Hiperexpressos nos LHC			Hipoexpressos nos LHC		
miRNA	Fold change	Valor p	miRNA	Fold change	Valor p
miR-222	0,43	0,035	miR-425-5p	-0,47	0,019
miR-24	0,46	0,019	let-7e	-0,49	0,013
miR-660	0,68	0,035	miR-194	-0,55	0,007
miR-324	0,74	0,023	miR-224	-0,57	0,023
miR-29a	0,78	0,003	let-7g	-0,72	0,035
miR-185	0,86	0,013	miR-365	-0,81	0,013
miR-27a	1,01	0,013	miR-30c	-0,81	0,001
miR-324-3p	1,12	0,035	miR-95	-0,82	0,023
miR-34c	1,19	0,035	miR-142-5p	-0,84	0,035
miR-22	1,24	0,002	miR-19a	-0,86	0,023
miR-146b	1,25	0,013	let-7a	-0,97	0,001
miR-519a	1,29	0,011	miR-30b	-1,09	0,001
miR-652	1,31	0,003	miR-101	-1,16	0,035
miR-210	1,33	0,023	miR-148a	-1,20	0,035
miR-345	1,43	0,013	miR-142-3p	-1,25	0,007
miR-517a	1,55	0,019	miR-140-3p	-1,25	0,007
miR-146b-3p	1,58	0,023	miR-455-3p	-1,44	0,007
miR-155	1,66	0,001	miR-200b	-1,49	0,035
miR-517c	1,66	0,023	miR-339-5p	-1,57	0,001
miR-34a	1,68	0,001	miR-20a	-1,68	0,003
miR-127	1,79	0,007	miR-598	-1,88	0,0335
miR-21	1,87	0,007	let-7f	-1,91	0,002
miR-886-5p	1,93	0,007	miR-26b	-2,09	0,023
miR-410	1,98	0,018	miR-26a	-2,14	0,023
miR-379	2,03	0,023	miR-139-5p	-2,21	0,023
miR-539	2,05	0,003	miR-149	-2,50	0,002
miR-125a-3p	2,13	0,013	miR-296	-2,54	0,002
miR-376a	2,16	0,013	miR-138	-2,71	0,013
miR-519d	2,23	0,011	miR-29c	-2,83	0,033
miR-503	2,48	0,005			
miR-542-5p	2,75	0,003			
miR-337-5p	2,81	0,007			



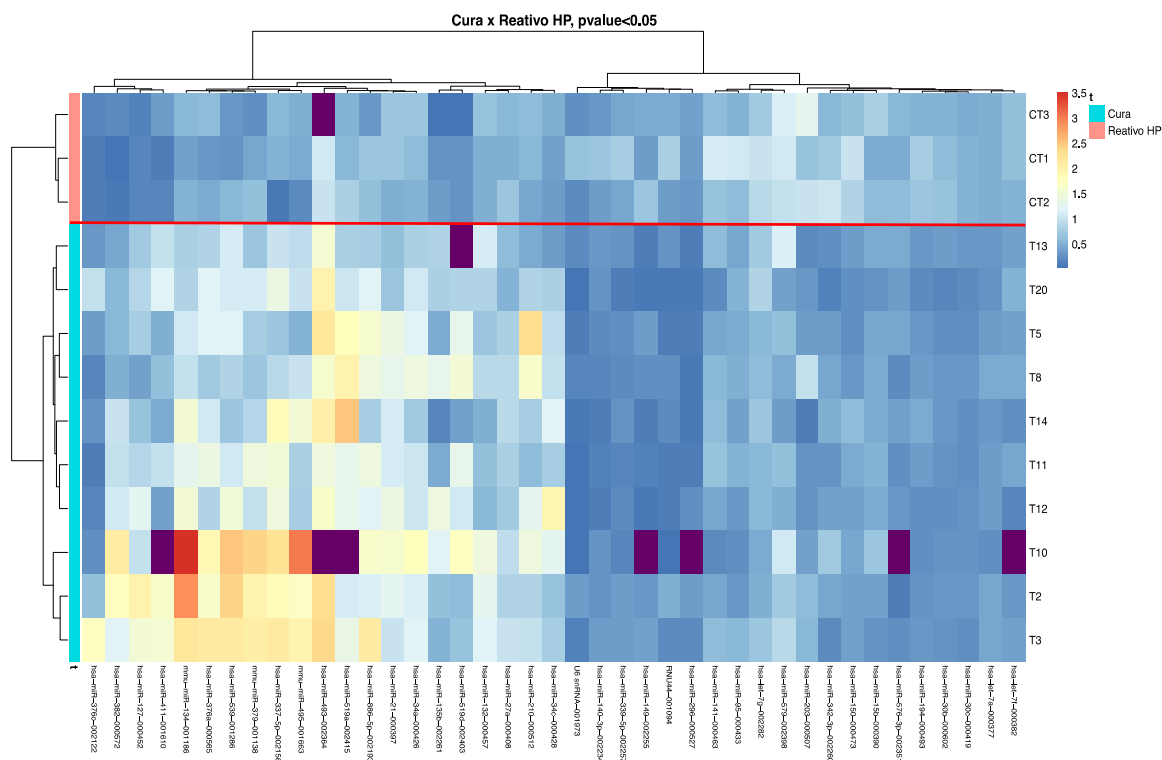


**Figura 25** - *Heatmap* demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia folicular. De forma ilustrativa, foi inserida uma linha vermelha horizontal na imagem. Acima dela encontram-se os casos de HF; abaixo, os casos de LHC. Para estes últimos, os microRNAs mais à esquerda foram os menos expressos, representados pelas cores de tonalidade azul; os mais à direita foram os mais expressos, com tonalidades de amarelo a vermelho. Os retângulos roxos indicam microRNAs que não foram amplificados na reação daquelas amostras.

Quando comparados os casos de Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e os linfonodos reativos com hiperplasia paracortical, foram identificados 39 microRNAs diferencialmente expressos. Nesta avaliação, também houve separação em grupos entre todos os casos de LHC e de HP (Tabela 7 e Figura 26).

**Tabela 7** - Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e linfonodos reativos com hiperplasia paracortical.

Hiperexpressos nos LHC			Hipoexpressos nos LHC		
miRNA	<i>Fold change</i>	Valor p	miRNA	<i>Fold change</i>	Valor p
miR-27a	0,78	0,048	miR-15b	-0,49	0,048
miR-210	0,98	0,048	miR-95	-0,54	0,048
miR-132	1,08	0,048	miR-141	-0,56	0,048
miR-21	1,23	0,048	let-7a	-0,57	0,006
miR-34a	1,36	0,006	miR-140-3p	-0,65	0,027
miR-376c	1,47	0,048	let-7f	-0,85	0,009
miR-34c	1,50	0,048	miR-339-5p	-0,88	0,006
miR-495	1,56	0,006	let-7g	-0,92	0,027
miR-135b	1,61	0,027	miR-576-3p	-1,09	0,018
miR-886-5p	1,65	0,006	miR-30c	-1,13	0,006
miR-493	1,81	0,036	miR-579	-1,15	0,048
miR-379	1,82	0,006	miR-342-3p	-1,26	0,027
miR-519a	1,84	0,009	miR-30b	-1,30	0,006
miR-376a	2,03	0,006	miR-194	-1,45	0,006
miR-134	2,13	0,006	miR-150	-1,45	0,006
miR-337-5p	2,25	0,006	miR-296	-1,83	0,036
miR-539	2,55	0,006	miR-149	-2,09	0,018
miR-519d	2,65	0,009	miR-203	-2,16	0,013
miR-127	3,01	0,006			
miR-411	3,23	0,009			
miR-382	4,45	0,006			

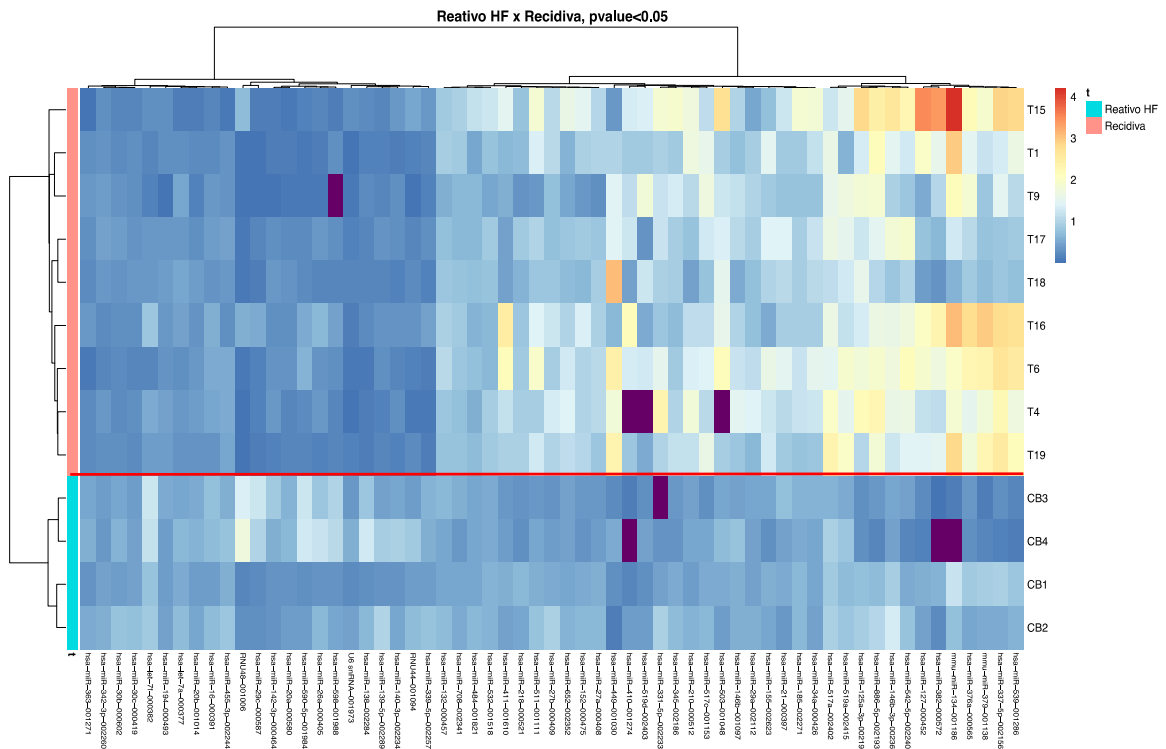


**Figura 26** - Heatmap demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico sem evidência de doença e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia paracortical. De forma ilustrativa, foi inserida uma linha vermelha horizontal na imagem. Acima dela encontram-se os casos de HP; abaixo, os casos de LHC. Para estes últimos, os microRNAs mais à esquerda foram os mais expressos, representados pelas cores de tonalidade variando entre amarelo e vermelho; os mais à direita foram os menos expressos, com tonalidades de azul. Os retângulos roxos indicam microRNAs que não foram amplificados na reação daquelas amostras.

Na comparação entre os casos de Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidivas e os linfonodos reativos com hiperplasia folicular, foram identificados 58 microRNAs diferencialmente expressos. Destes, 38 estavam hiperexpressos nos casos de linfoma, com 20 estando hipoexpressos. Com base nestes microRNAs, foi possível uma separação destas amostras em dois grupos inteiramente distintos (Tabela 8 e Figura 27).

**Tabela 8** - Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva e linfonodos reativos com hiperplasia folicular.

Hiperexpressos nos LHC			Hipoexpressos nos LHC		
miRNA	Fold change	Valor p	miRNA	Fold change	Valor p
miR-484	0,60	0,020	miR-194	-0,43	0,034
miR-532	0,63	0,034	miR-342-3p	-0,59	0,034
miR-185	0,74	0,003	miR-142-3p	-0,81	0,037
miR-132	0,76	0,011	miR-20b	-0,81	0,011
miR-708	0,82	0,003	miR-30c	-0,83	0,003
miR-146b	1,21	0,034	let-7a	-1,00	0,011
miR-29a	1,27	0,011	miR-455-3p	-1,11	0,003
miR-27a	1,31	0,034	miR-16	-1,14	0,034
miR-218	1,36	0,034	miR-140-3p	-1,15	0,011
miR-652	1,44	0,020	miR-30b	-1,19	0,003
miR-27b	1,46	0,034	miR-363	-1,20	0,011
miR-345	1,48	0,003	miR-20a	-1,56	0,003
miR-517a	1,52	0,003	let-7f	-2,04	0,006
miR-411	1,56	0,020	miR-598	-2,18	0,008
miR-21	1,58	0,003	miR-139-5p	-2,23	0,003
miR-152	1,60	0,020	miR-339-5p	-2,29	0,006
miR-519a	1,67	0,020	miR-26a	-2,50	0,037
miR-34a	1,73	0,003	miR-590-5p	-2,51	0,034
miR-210	1,87	0,020	miR-138	-2,51	0,003
miR-146b-3p	1,91	0,034	miR-29c	-3,21	0,011
miR-155	1,95	0,006			
miR-517c	1,95	0,003			
miR-511	1,97	0,034			
miR-331-5p	2,13	0,036			
miR-519d	2,18	0,016			
miR-503	2,35	0,004			
miR-125a-3p	2,39	0,007			
miR-542-5p	2,81	0,003			
miR-134	2,85	0,036			
miR-886-5p	2,95	0,003			
miR-127	3,02	0,020			
miR-539	3,13	0,006			
miR-376a	3,27	0,003			
miR-410	3,40	0,012			
miR-379	3,46	0,020			
miR-449	3,53	0,006			
miR-382	3,88	0,018			
miR-337-5p	4,14	0,011			

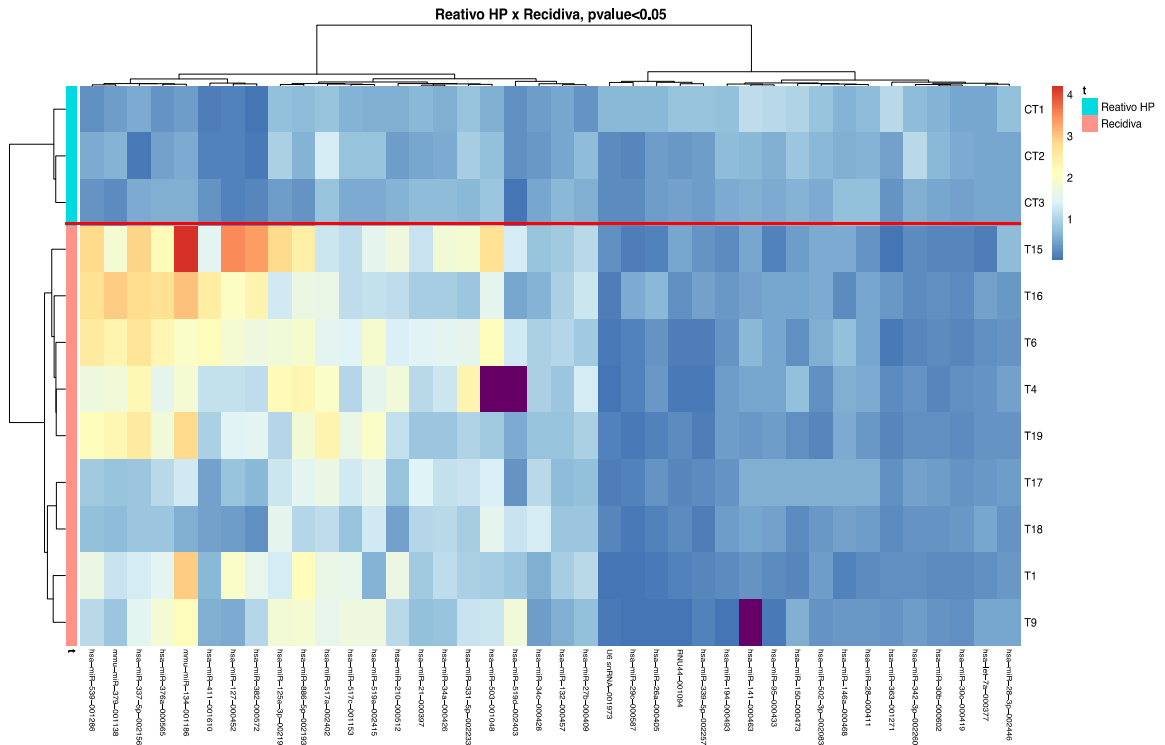


**Figura 27** - *Heatmap* demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidiva e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia folicular. De forma ilustrativa, foi inserida uma linha vermelha horizontal na imagem. Acima dela encontram-se os casos de LHC; abaixo, os casos de HF. Para os casos do linfoma, os microRNAs mais à direita foram os mais expressos, representados pelas cores de tonalidade variando entre amarelo e vermelho; os mais à esquerda foram os menos expressos, com tonalidades de azul. Os retângulos roxos indicam microRNAs que não foram amplificados na reação daquelas amostras.

Os casos de pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva apresentaram 38 microRNAs expressos de forma diferencial em relação aos casos de hiperplasia paracortical. Vinte e dois microRNAs demonstraram hiperexpressão nos casos de linfoma, enquanto que 16 estavam menos expressos (Tabela 9). A utilização deste conjunto de microRNAs também possibilitou uma separação completa no agrupamento destas amostras, como demonstrado na Figura 28.

**Tabela 9** - Comparação dos microRNAs diferencialmente expressos entre amostras de Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva e linfonodos reativos com hiperplasia paracortical.

Hiperexpressos nos LHC			Hipoexpressos nos LHC		
miRNA	Fold change	Valor p	miRNA	Fold change	Valor p
miR-21	0,94	0,009	miR-146a	-0,24	0,036
miR-331-5p	0,96	0,018	miR-95	-0,47	0,018
miR-27b	1,04	0,009	miR-28-3p	-0,49	0,036
miR-132	1,04	0,018	miR-141	-0,58	0,048
miR-34c	1,28	0,018	let-7a	-0,60	0,009
miR-34a	1,41	0,009	miR-502-3p	-0,93	0,036
miR-503	1,49	0,012	miR-28	-1,06	0,009
miR-210	1,51	0,036	miR-363	-1,08	0,036
miR-517c	1,53	0,018	miR-30c	-1,16	0,009
miR-517a	1,77	0,036	miR-29c	-1,26	0,036
miR-125a-3p	1,79	0,009	miR-194	-1,33	0,009
miR-519a	2,23	0,018	miR-150	-1,33	0,018
miR-519d	2,60	0,012	miR-30b	-1,40	0,009
miR-886-5p	2,67	0,009	miR-26a	-1,43	0,042
miR-376a	3,15	0,009	miR-342-3p	-1,59	0,009
miR-411	3,20	0,009	miR-339-5p	-1,60	0,036
miR-379	3,26	0,009			
miR-134	3,47	0,009			
miR-337-5p	3,59	0,009			
miR-539	3,64	0,009			
miR-127	4,25	0,009			
miR-382	5,51	0,009			



**Figura 28** - *Heatmap* demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidiva e as amostras de linfonodo reativo com hiperplasia paracortical. De forma ilustrativa, foi inserida uma linha vermelha horizontal na imagem. Acima dela encontram-se os casos de HP; abaixo, os casos de LHC. Para os casos do linfoma, os microRNAs mais à esquerda foram os mais expressos, representados pelas cores de tonalidade variando entre amarelo e vermelho; os mais à direita foram os menos expressos, com tonalidades de azul. Os retângulos roxos indicam microRNAs que não foram amplificados na reação daquelas amostras.

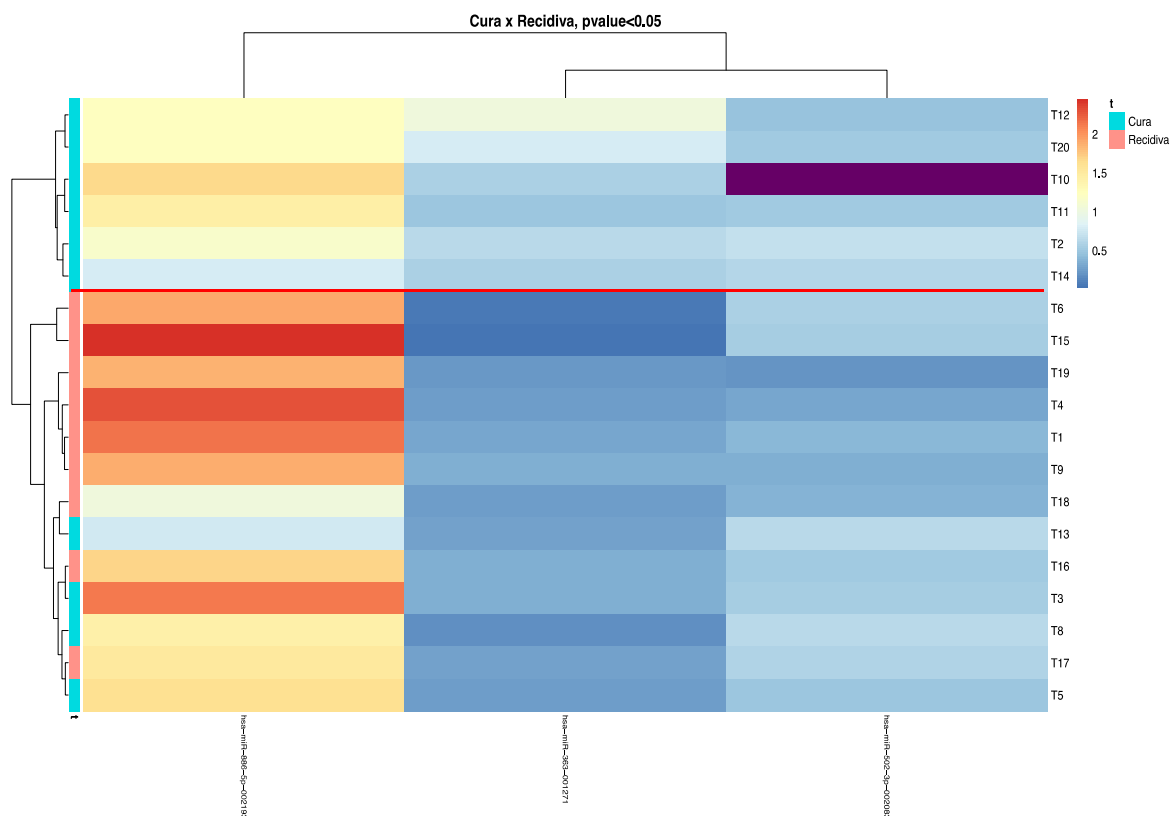
Os microRNAs também foram comparados entre os casos dos pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin clássico, em busca das diferenças na dependência do desfecho clínico escolhido. Nesta avaliação, somente 3 microRNAs foram encontrados diferencialmente expressos, com significância estatística. Foi observado que o microRNA miR-886-5p encontrava-se hiperexpresso em todos casos que evidenciaram recidiva, com *fold change* de 1,01 e valor p igual a 0,013. Os outros dois microRNAs

estavam menos expressos nos casos recidivados. São eles: o microRNA miR-502-3p, com fold change de -0,62 e valor p igual a 0,04 e o microRNA miR-363, com fold change de - 1,37 e valor p igual a 0,017. Estes resultados encontram-se demonstrados na Tabela 10 e na Figura 29.

**Tabela 10** - Comparação entre os microRNAs diferencialmente expressos nas amostras de Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva e aqueles sem evidência de doença após a terapia.

Hiperexpresso nos LHC recidivados			Hipoexpressos nos LHC recidivados		
miRNA	<i>Fold change</i>	Valor p	miRNA	<i>Fold change</i>	Valor p
miR-886-5p	1,01	0,013	miR-502-3p	-0,62	0,040
			miR-363	-1,37	0,017





**Figura 29** - *Heatmap* demonstrando os microRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com Linfoma de Hodgkin clássico que apresentaram recidiva e aqueles sem evidência de doença. De forma ilustrativa, foi inserida uma linha vermelha horizontal na imagem. Acima dela encontram-se somente casos de LHC sem evidência de doença; abaixo da mesma, observam-se todos os casos de LHC que exibiram recidiva, além de 4 casos sem evidência de doença, que através do agrupamento hierárquico não supervisionado acabaram por agrupar-se junto aos casos recidivados. Abaixo da linha vermelha, o microRNA miR-886-5p, mais à esquerda, esteve hiperexpresso, representado pelas cores de tonalidade variando entre amarelo e vermelho; os dois microRNAs mais à direita, miR-502-3p e miR-363, estiveram menos expressos, com tonalidades de azul. O retângulo roxo indica que microRNA não foi amplificado na reação daquela amostra.

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 VISÃO GERAL**

Este estudo avaliou o perfil de expressão de diversos microRNAs em Linfomas de Hodgkin clássico diagnosticados no Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. A fim de se estabelecer uma comparação, foram selecionados casos nos quais não foi observada recidiva e também casos que apresentaram recidiva do Linfoma após à terapia empregada. Para a seleção de material apropriado para a realização do experimento com os microRNAs, que foi proveniente de tecido fixado em formalina e processado em parafina, foram revistos inicialmente 144 casos de Linfoma de Hodgkin.

A revisão das lâminas originais resultou na exclusão de 38 casos, seja pela não confirmação do diagnóstico de Linfoma de Hodgkin clássico ou pela indisponibilidade do material no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Esta análise anatomopatológica possibilitou, para os 106 casos remanescentes, a avaliação e coleta de dados referentes à morfologia do material examinado, bem como em relação aos marcadores imunohistoquímicos frequentemente utilizados no processo diagnóstico desta neoplasia, particularmente os anticorpos CD20, CD3, CD30 e CD15. Adicionalmente, uma série de dados clínicos, evolutivos e laboratoriais foram coletados a partir do prontuário eletrônico dos pacientes para a uma análise

estatística envolvendo estas variáveis.

## 6.2 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Em relação aos dados clínicos e epidemiológicos, não houve diferença de acometimento entre os sexos. A idade média dos pacientes foi de 38,3 anos. A maioria deles apresentou-se em estádios I e II (59,5%). Cerca de um terço dos casos apresentava doença *bulky* ao diagnóstico. O acometimento de medula óssea foi um achado infrequente (8,5%). A maioria desta casuística era portador do subtipo esclerose nodular do Linfoma de Hodgkin clássico (85,1%). Com exceção de 2 casos, todos os demais foram tratados com o esquema ABVD.

Todos estes dados estão em consonância com a literatura recente no que diz respeito ao Linfoma de Hodgkin clássico. Adicionalmente, os dados de sobrevida observados também foram bastante semelhantes à maioria dos dados publicados em casuísticas americanas e brasileiras (Ministério da Saúde 2018; HOWLADER et al. 2019).

Digno de nota, a predominância do subtipo esclerose nodular é um fenômeno observado no Brasil apenas mais recentemente. Associado a melhores condições sociais e econômicas, sua prevalência alta é observada em países europeus e norte-americanos. Este achado já foi encontrado e reportado em uma publicação recente (CAMPOS et al. 2018), que mostra uma distribuição de subtipos no Brasil mais semelhante àquela do mundo desenvolvido. A frequência detectada do vírus de Epstein-Barr também se

aproxima da observada em outros estudos, tendo sido 12,3% para toda a coorte, com somente 10,9% dos casos de esclerose nodular sendo positivos e 60% dos casos portadores do subtipo celularidade mista.

### **6.3 CORRELAÇÃO COM DADOS DE SOBREVIDA**

Em relação à correlação das variáveis clínicas, laboratoriais e imuno-histoquímicas com o desfecho dos pacientes, apesar da expressão de CD20 em células neoplásicas e a presença de raras células CD15 positivas terem demonstrando uma associação com sobrevida global, estes foram achados somente detectados na análise univariada. Quando uma avaliação multivariada foi realizada, somente a idade de 60 anos ou mais e níveis séricos elevados de DHL (acima de 352 U/L) mantiveram-se como fatores prognósticos relevantes em relação à sobrevida global. Em relação à sobrevida livre de progressão, os parâmetros imuno-histoquímicos não se mostraram estatisticamente significantes. Nesta análise, apenas o estadiamento avançado e níveis reduzidos de albumina sérica demonstraram associação com pior prognóstico.

Diversos estudos tentaram demonstrar a associação de parâmetros anatomopatológicos com a evolução clínica dos doentes, no intuito de identificar biomarcadores prognósticos que pudessem denotar maior agressividade tumoral, detectados por um método com custo relativamente baixo e amplamente difundido, como é o caso da imuno-histoquímica. A maioria das publicações ou encontrou uma associação fraca destes

parâmetros com o desfecho, ou foi um achado que não pode ser reproduzido em estudos subsequentes, ou não foi observada associação. Estes achados vão ao encontro das observações realizadas no presente estudo, no qual mesmo as associações encontradas para alguns parâmetros imuno-histoquímicos em análises univariadas não se mantiveram presentes quando o conjunto de variáveis era considerado na avaliação (RASSIDAKIS et al. 2002b). De qualquer forma, são parâmetros que naturalmente fazem parte do *work up* diagnóstico do Linfoma de Hodgkin clássico e geralmente são ou podem ser referidos nos laudos imuno-histoquímicos. Ainda que não possuam peso para mudança de conduta terapêutica, estes dados podem ser utilizados pelo hematologista assistente, em conjunto com os parâmetros clínicos e laboratoriais estabelecidos em *guidelines* e em protocolos de tratamento, para um melhor entendimento do comportamento biológico de cada neoplasia, contribuindo assim para a prática atualmente conhecida como medicina personalizada (VENKATARAMAN et al. 2014).

#### **6.4 PERFIL DE EXPRESSÃO DE MICRORNAS**

A etapa seguinte e principal deste projeto foi a avaliação do perfil de expressão de microRNAs nos Linfomas de Hodgkin clássicos. Para sua execução, por limitações orçamentárias, somente um número restrito de amostras teria possibilidade de ser testado. Adicionalmente, para normalizar as reações e análises posteriores, controles contendo tecido linfóide normal e/ou hiperplásico deveria ser utilizado. Na tentativa de identificação de um

microRNA que pudesse potencialmente funcionar como biomarcador de maior agressividade biológica, foram selecionados 10 casos que apresentaram recidivas e 10 casos que não haviam recidivado. A fim de uniformizar os demais parâmetros anatomopatológicos e garantir material com qualidade adequada para a realização de todo o experimento com microRNAs, foram selecionados somente casos de Linfoma de Hodgkin, subtipo esclerose nodular, que não demonstraram a presença do vírus de Epstein-Barr pelo método de hibridização *in situ* cromogênica.

A escolha do mesmo subtipo histológico foi necessária pois estudo anterior avaliando o panorama geral da expressão de microRNAs em Linfomas de Hodgkin clássico já demonstrou que há diferenças significativas entre os subtipos esclerose nodular e celularidade mista, portanto este poderia constituir um fator de confusão para a análise estatística e identificação de um marcador que pudesse separar os casos com base no desfecho e não no padrão histológico. Da mesma forma, utilizando esta mesma lógica, optou-se por não utilizar casos EBV positivos, pois o mesmo estudo identificou que os casos associados ao EBV possuem microRNAs diferencialmente expressos em relação aos casos que são negativos para o vírus (NAVARRO et al. 2008). Sendo assim, um eventual microRNA encontrado diferencialmente nesta situação levantaria a dúvida quanto à sua causa, se induzida pelo vírus ou pelo comportamento biológico intrínseco do linfoma. Adicionalmente a estes dados já presentes na literatura, não havia uma quantidade suficiente de casos dos outros subtipos histológicos que possibilitassem uma comparação mais homogênea. O subtipo esclerose

nodular foi o mais prevalente e com a possibilidade de avaliação de casos com recidiva e sem recidiva, disponíveis para comparação.

Destes, além disso, a frequência de positividade para EBV foi baixa, o que não permitiria utilizar somente casos EBV positivos, o que seria uma outra forma de padronização. Finalmente, levando em consideração todos estes fatores, foram elencados somente os casos de LHCEN, EBV negativos, com e sem recidiva. Como amostras para servirem de controle, foram selecionados 8 casos de linfonodos reativos, 4 deles com padrão de hiperplasia folicular, que é o compartimento linfonodal onde predominam linfócitos B e 4 com padrão de hiperplasia paracortical, que é o compartimento com predomínio de linfócitos T.

Todos os casos selecionados possuíam amostras referentes à exérese cirúrgica de linfonodos, com o objetivo de disponibilizar a maior quantidade possível de material para o experimento; casos somente com material proveniente de biópsias por agulha foram preteridos pela possibilidade da não obtenção de material suficiente. Ainda assim, em dois dos casos selecionados não foi possível a realização da extração de RNA. Em um deles, um Linfoma de Hodgkin clássico recidivado, o material foi requerido pelo paciente; em outro, um linfonodo reativo com hiperplasia paracortical, o bloco de parafina não estava disponível no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica no momento da requisição para este ensaio. Diante da exclusão destas duas amostras, o experimento da avaliação da expressão dos microRNAs deu-se com 10 amostras de LHCEN sem recidiva, 9 casos recidivados, 4 casos de linfonodo reativo com

hiperplasia folicular e 3 casos de linfonodo reativo com hiperplasia paracortical, totalizando 26 amostras.

#### **6.4.1 Comparação com Linfonodos Reativos**

Na avaliação global do perfil de expressão de expressão dos microRNAs, todos os casos de linfonodo reativo agruparam-se no mesmo agrupamento principal. Mais próximos destes posicionaram-se predominantemente os casos de Linfoma de Hodgkin clássico sem recidiva. Por fim, abaixo deles, esteve a maioria dos casos de Linfoma de Hodgkin clássico com recidiva (Figura 24).

Entre os casos de linfonodo reativo, somente um microRNA esteve diferencialmente expresso, notadamente o miR-24, com uma variação de 0,42 em favor dos casos de hiperplasia paracortical. Este microRNA já havia sido reconhecido por INADA et al. (2018) como sendo estável em linfonodos reativos e um bom candidato para ser utilizado como normalizador em amostras linfonodais de material incluído em parafina. Este estudo, que utilizou 16 amostras de linfonodo sem evidência de neoplasia, não especifica se foi observado algum padrão predominante de reatividade nesses linfonodos. A média de idade dos pacientes destas amostras era de 76 anos (com variação entre 51 e 83 anos), o que torna menos provável que exibissem hiperplasia folicular predominante (INADA et al. 2018). O achado do presente estudo não está previamente descrito no âmbito de linfonodos reativos, pois não há experimento prévio visando a comparação com base no padrão da hiperplasia. Em relação ao miR-24, o mesmo já foi descrito



como possuindo diversos potenciais alvos, como por exemplo o p16(INK4a) (LAL et al. 2008) e outros genes envolvidos no ciclo celular, como E2F2 e MYC (LAL et al. 2009). Desta forma, uma das possibilidades que justifique este achado seria que o miR-24 estaria associado à inibição da proliferação celular na hiperplasia paracortical, como um mecanismo hipotético de autorregulação do processo imune presente nestes quadros reativos.

Em todas as comparações realizadas no presente estudo, os casos de Linfoma de Hodgkin clássico, sejam eles portadores de recidiva ou não, demonstraram um perfil de expressão de microRNAs diferente dos linfonodos reativos, independente do padrão, seja de hiperplasia folicular ou paracortical, sob o método de agrupamento hierárquico não supervisionado.

Esta diferença já havia sido identificada em estudos prévios. NAVARRO et al. em 2008, avaliaram por PCR a expressão de microRNAs em 49 casos de Linfoma de Hodgkin clássico e 10 linfonodos reativos. Eles identificaram uma assinatura de 25 microRNAs diferencialmente expressos entre os grupos. Adicionalmente, os autores identificaram que havia diferença no perfil entre os subtipos esclerose nodular e celularidade mista, bem como encontraram 4 microRNAs com regulação diminuída nos casos associados ao EBV (NAVARRO et al. 2008).

PAYDAS et al. em 2016, também avaliaram casos de Linfoma de Hodgkin clássico (32 casos), comparando-os com linfonodos reativos (60 amostras). Estudando 377 microRNAs, os autores encontraram um perfil diferente entre estes grupos, ressaltando ainda que o microRNA 127-3p esteve hiper-regulado no subtipo esclerose nodular em comparação com o

subtipo celularidade mista.

#### **6.4.1.1 miR-21**

Nestes e também em outros estudos, o microRNA miR-21 foi aquele encontrado por mais autores como estando hiperexpresso em Linfomas de Hodgkin clássico, seja em amostras de tecido contendo linfonodos acometidos como um todo, em culturas celulares, no plasma dos pacientes e também em células HRS microdissecadas a partir de lâminas histológicas (NAVARRO et al. 2008; VLIERBERGHE et al. 2009; GIBCUS et al. 2009; SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN et al. 2013; JONES et al. 2014).

No presente estudo, assim como nos acima referidos, foi observado que o microRNA miR-21 esteve hiperexpresso em ambos os grupos de Linfoma de Hodgkin clássico em todas as comparações realizadas com linfonodos reativos. SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN et al. (2013) encontraram associação entre a hiperexpressão deste microRNA e sobrevida livre de falha, propondo que o mesmo possui um papel na resistência à apoptose, pois a inibição de miR-21 levou ao aumento de apoptose da linhagem celular L-428, bem como redução na relação entre Bcl-2 e Bax. Estes alvos, entretanto, não foram validados e podem corresponder a um efeito secundário da hiperexpressão de miR-21. No presente estudo, este marcador não foi encontrado diferencialmente expresso entre os casos recidivados e sem recidiva. Esta diferença pode estar relacionada ao fato da coorte de validação daquele estudo ter sido constituída somente de casos de pacientes com doença avançada, enquanto que os critérios de inclusão no

experimento de microRNA do presente estudo foram somente o subtipo morfológico (esclerose nodular) e ausência de associação com EBV, estratificados pela presença ou não de recidiva (SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN et al. 2013).

#### **6.4.1.2 miR-155**

Outro microRNA encontrado hiperexpresso neste estudo e que já possui associação descrita na literatura com o Linfoma de Hodgkin clássico é o miR-155. O primeiro artigo demonstrando esta associação foi o estudo de KLUIVER et al. (2005), que observaram altos níveis de miR-155 em cinco linhagens celulares de Linfoma de Hodgkin, além de sua hiperexpressão em 7 casos de pacientes portadores de LH. Posteriormente, em 2009, GIBCUS et al. reportaram não somente a relação entre linhagens celular de LH e miR-155, como também demonstraram que os genes AGTR1, FGF7, ZNF537, ZIC3 e IKBKE são potenciais genes alvo do miR-155. Neste estudo, a função deste microRNA parece estar associada a contrabalancear os mecanismos de proliferação celular das linhagens celulares de LH, pois estes genes alvo estão associados a algum mecanismo de proliferação. IKBKE, por exemplo, está relacionado à ativação da via NF-κB e FGF7 é um fator de crescimento fibroblástico associado à ativação de Akt, ambos estes mecanismos sendo ativos no Linfoma de Hodgkin clássico (GIBCUS et al. 2009).

É interessante ressaltar que a hiperexpressão observada no presente estudo só foi detectada, para ambos os grupos de LHC, quando comparados

com linfonodos reativos com hiperplasia folicular, não estando presente quando a comparação foi realizada com os linfonodos reativos com hiperplasia paracortical. JONES et al. em 2014, em um estudo cujo objetivo principal era avaliar microRNAs circulantes no plasma como biomarcadores de resposta em LHC, também não observaram diferença nos níveis de miR-155 quando compararam o tecido de 14 casos de LHC com 8 casos de linfonodos sem neoplasia. Estes linfonodos utilizados na comparação eram provenientes de disseções axilares secundárias a neoplasias de mama e provavelmente não possuíam um componente de hiperplasia folicular como um dos grupos de linfonodos reativos usados neste estudo (JONES et al. 2014). Em outro estudo cujo miR-155 esteve diferencialmente expresso entre casos de LHC e linfonodos reativos, PAYDAS et al. (2016) compararam 34 casos de LHC com 60 linfonodos reativos, sem especificar o padrão de reatividade. Como os casos de hiperplasia folicular são mais comuns que os de hiperplasia paracortical (WEISS e O'MALLEY 2013), é provável que este grupo comparador estivesse enriquecido por este tipo de hiperplasia, resultando na diferença de expressão de miR-155 encontrada pelos autores (PAYDAS et al. 2016). Apesar de não ter sido encontrada uma diferença de expressão do miR-155 entre os casos de hiperplasia folicular e paracortical, provavelmente este microRNA possuía níveis mais elevados nos casos de hiperplasia paracortical, fato que na comparação com os casos de Linfoma de Hodgkin clássico não resultou em diferença estatisticamente significativa. Este dado pode ser justificado pelo fato deste microRNA também estar associado à ativação de células T (HU et al. 2014). Apesar

deste achado, quando comparado entre os casos de Linfoma de Hodgkin clássico, o miR-155 não esteve diferencialmente expresso.

#### **6.4.1.3 miR-9**

Este estudo não encontrou a hiperexpressão do microRNA miR-9 em nenhuma das comparações envolvendo os casos de LHC. Dos principais estudos que avaliaram a expressão de microRNAs em LHC, 3 deles haviam encontrado este microRNA como diferencialmente expresso, em contraste com o achado deste experimento. Esta discrepância pode ser explicada pois 2 dos referidos estudos utilizaram ou células de culturas celulares ou células HRS microdissecadas a partir de amostras de tecido (VLIERBERGHE et al. 2009; GIBBUS et al. 2009). No terceiro estudo, o aumento dos níveis de miR-9 só foi observado no subtipo celularidade mista e não na esclerose nodular (NAVARRO et al. 2008). Conforme já mencionado, esta avaliação pré-selecionou casos de LHC esclerose nodular para homogeneizar a comparação, fez uso de cortes do tecido inteiro para o experimento e comparou com linfonodos reativos, metodologia diferente daquela aplicada nos referidos estudos. A ação do miR-9 se dá pela regulação negativa do gene PRDM1/BLIMP1, um gene muito importante na diferenciação terminal das células B, quando as mesmas se diferenciam em plasmócitos (SHAFFER et al. 2002; NIE et al. 2008). Este gene, por sua vez, é também regulado pela molécula CD99, que geralmente tem redução de sua expressão nas células HRS como parte da oncogênese do LHC. Há evidências, ainda, que o EBV pode estar associado à esta diminuição de

expressão do CD99. Desta forma, racionalizando este mecanismo, o EBV induziria à redução de CD99, que por sua vez leva à hiperexpressão de PRDM1/BLIMP1, que por mecanismo compensatório levaria ao aumento dos níveis de miR-9 (KIM et al. 2000; HUANG et al. 2012). Este processo justificaria o encontro da expressão diferencial do miR-9 como estando mais associado ao subtipo celularidade mista, pois trata-se do subtipo mais associado à infecção por EBV. Como este subtipo não foi incluído na análise pela sua baixa prevalência, a hiperexpressão de miR-9 não foi detectada. Semelhante a este achado, outros três estudos que fizeram uso de material incluído em parafina, sem microdissecção, também não observaram elevação deste microRNA (SÁNCHEZ-ESPIRIDIÓN et al. 2013; JONES et al. 2014; PAYDAS et al. 2016).

Além destes microRNAs frequentemente referidos na literatura como estando associados ao LHC, no presente estudo foram identificados 2 microRNAs em altos níveis nos casos de LHC nas comparações realizadas com os grupos de linfonodos reativos. Foram eles os microRNAs miR-337-5p (com *fold change* variando entre 2,25 e 4,14) e miR-382 (*fold change* entre 4,45 e 5,51). Estes 2 microRNAs não haviam sido descritos previamente como associados ao LHC.

#### **6.4.1.4 miR-337-5p**

O microRNA miR-337-5p já foi associado a maior agressividade biológica em pacientes portadores de osteossarcoma, em um estudo que avaliou 65 casos. Os autores constataram que os pacientes que possuíam

maiores níveis de expressão deste microRNA tiveram menor sobrevida global e mais metástases pulmonares. Além disto, este estudo demonstrou que a transfecção deste microRNA em culturas celulares de osteossarcoma aumentou a viabilidade celular, indicando uma função de proliferação e invasão, provavelmente por ativação de ERBB2, Erk1/2 e VEGF121, pois um aumento na expressão destas moléculas também foi detectado nas células com altos níveis de miR-337-5p (TIAN et al. 2018).

Este microRNA também já foi associado a evolução adversa em pacientes portadores de leucemia mieloide aguda que exibiam um polimorfismo do gene NPM1 na região 3'-não traduzida. Segundo os autores, este polimorfismo modifica o sítio de ligação de microRNAs do gene NPM1, criando um local para a regulação por parte do miR-337-5p. A transfecção deste microRNA em culturas de células com esta alteração de NPM1 promoveu sua supressão. Pacientes com este polimorfismo tiveram maior probabilidade de recaída e sobrevida global significativamente reduzida (CHENG et al. 2013). Apesar deste dois estudos, a função e os alvos do miR-337-5p são pouco conhecidos e constituem um campo a ser investigado. Na comparação entre os grupos de LHC presentes no presente projeto, não foi observada diferença de expressão entre os grupos com ou sem recidiva.

#### **6.4.1.5 miR-382**

O microRNA miR-382, presente em altos níveis nos LHC na maioria das comparações realizadas, em contraste ao miR-337-5p, é referido por

vários autores como estando relacionado à inibição da proliferação e migração de células neoplásicas malignas, bem como do desenvolvimento de metástases. Esta função de supressor de tumor já foi demonstrada em diversos tipos histológicos, como carcinomas colorretais (CCR), prostáticos, esofágicos, hepatocarcinoma e carcinomas de pulmão não-pequenas células (QI et al. 2015; ZHANG et al. 2016; CHEN et al. 2017; FENG et al. 2017; REN et al. 2018; ZHANG et al. 2018; CHEN et al. 2019; YAO et al. 2019). Em adenocarcinomas de próstata, o mecanismo proposto de ação do miR-382 seria através da inibição dos genes ativados pelo gene COUP-TFII (*chicken ovoalbumin upstream promoter transcription factor II*), como por exemplo *Snail* e o gene da metaloproteinase de matriz 2 (MMP2). Os autores sugerem que este seria um importante mecanismo patogénico desta neoplasia (ZHANG et al. 2016). Em carcinomas colorretais, um dos estudos demonstrou que este microRNA encontra-se hipoexpresso nos tecidos neoplásicos e linhagens celulares, entretanto, a transfecção deste microRNA reduziu o crescimento e migração celulares. Adicionalmente, os autores estabeleceram o gene SP1 como um outro potencial alvo do miR-382, pois encontraram concentrações inversamente proporcionais destas moléculas nos CCR (REN et al. 2018). Um terceiro estudo, avaliando tanto carcinomas de pulmão não-pequenas células (CPNPC) em tecido quanto em células em meio de cultura, demonstrou que este microRNA também é hiporregulado nos CPNPC, propondo o gene LMO3 como um outro alvo do miR-382. Neste estudo, a hiperexpressão de miR-382 também promoveu a supressão da proliferação e migração das células de CPNPC (CHEN et al.



2019).

Outro papel atribuído a este microRNA, fora do âmbito das neoplasias, é a participação na gênese de quadros fibróticos, como por exemplo a fibrose renal, tanto medular quanto túbulo-intersticial, bem como a fibrose epidural (KRIEGEL et al. 2012; FANG et al. 2017; LIN et al. 2018; HU et al. 2018). Um destes estudos, em uma avaliação *in vivo* com um modelo experimental de fibrose renal intersticial, demonstrou que o miR-382 teve como alvo a calicreína 5, molécula que atua na degradação de diversos componentes da matriz extracelular. A hiperexpressão deste microRNA reduziu os níveis de calicreína 5 e contribuiu para o desenvolvimento da fibrose renal (KRIEGEL et al. 2012). Outro estudo, avaliando fibroblastos em meio de cultura oriundos de cicatrizes epidurais, demonstrou que o miR-382-5p não alterou a taxa de proliferação destas células, mas sua hiperexpressão, induzida pelo tratamento com o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-B1), elevou os níveis de colágeno I A1, contribuindo para a ocorrência e desenvolvimento da fibrose (LIN et al. 2018).

Como as evidências acima mencionadas mostram que o miR-382 ou está associado a uma função antiproliferativa e supressora tumoral, ou pode estar relacionado ao desenvolvimento de quadros fibróticos, o achado da presença da hiperexpressão deste microRNA nas amostras de LHC do presente estudo pode ser atribuída ao microambiente tumoral e não à neoplasia em si. O microambiente dos Linfomas de Hodgkin clássico, esclerose nodular, além de possuir uma grande variedade de células

inflamatórias de permeio às células neoplásicas, também exhibe, como o próprio nome do subtipo implica, uma grande quantidade de tecido fibroso que separa nódulos. Os níveis encontrados deste microRNA podem ter sido provenientes dos fibroblastos contidos nos septos fibrosos, uma vez que para a extração de RNA e realização do experimento com os microRNAs, foram utilizados os cortes inteiros do material parafinado, contendo tanto as células HRS quanto seu microambiente. Os linfonodos reativos utilizados na comparação, apesar de apresentarem alguma expansão dos compartimentos linfoides B e T, não apresentavam áreas de fibrose ou espessamento capsular que pudessem conter grandes quantidades de células estromais. Na comparação entre os dois grupos de LHC, entretanto, também não foi detectada diferença de expressão significativa deste microRNA.

#### **6.4.2 Comparação entre os Casos de Linfoma de Hodgkin Clássico**

De todos os microRNAs estudados, apenas 3 mostraram-se diferencialmente expressos entre os casos de Linfoma de Hodgkin clássico. Estes 3 microRNAs foram capazes de separar dois grupos de pacientes, com níveis de expressão significativamente distintos. Nominalmente, estes microRNAs foram o miR-886-5p, o miR-502-3p e o miR-363. O primeiro grupo, que exibiu menor expressão de miR-886-5p e maior expressão dos outros dois microRNAs, conteve somente casos que não exibiram recidiva do linfoma. O segundo grupo foi composto por todos os casos recidivados e 4 casos que não apresentaram recidivas. Neste grupo, houve maior

expressão do miR-886-5p (*fold change* de 1,01), com expressão reduzida de miR-502-3p (*fold change* de -0,62) e miR-363 (*fold change* de -1,37).

#### 6.4.2.1 miR-502-3p

O microRNA miR-502-3p ainda é um microRNA pouco estudado na literatura. NING et al. em 2014, demonstraram que carcinomas de células de Merkel possuem este miRNA hiper-regulado. Estes autores encontraram esta expressão comparando 20 amostras desta neoplasia com amostras de pele normal e outras neoplasias, como melanoma, carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas, a partir de tecido incluído em parafina. Entretanto, ao comparar tecido congelado de metástases linfonodais de carcinomas de células de Merkel com tecidos humanos normais, este microRNA não demonstrou níveis elevados (NING et al. 2014). Em um ensaio avaliando o perfil de microRNAs circulantes em pacientes portadores de carcinomas de pulmão não-pequenas células avançado, com histologia não escamosa, o microRNA miR-502-3p demonstrou tratar-se de um fator de bom prognóstico, correlacionando-se com maior tempo até progressão da doença e menor risco de óbito, com *hazard ratio* de 0,35 (0,14-0,87) e 0,34 (0,14-0,83), respectivamente (JOERGER et al. 2014). Outros estudos também associaram este microRNA como fazendo parte do perfil de adenocarcinomas de pulmão com mutação de EGFR, que em geral são neoplasias com melhor prognóstico em relação aos EGFR-selvagens, tanto intrinsecamente quanto pelo fato de predizerem resposta à inibidores tirosina-quinase (BJAANÆS et al. 2014; SUBAT et al. 2018). Neste grupo de

neoplasias, BJAANÆS et al. (2014) propuseram que o miR-502-3p pode exercer efeito regulatório sobre a proteína RASSF (ativadora de RAS) e as ciclinas dependentes de quinase 4 e 6 (CDK4/6). Desta forma, pelo modelo descrito pelos autores, a hiperexpressão deste miRNA levaria à redução da transcrição destes alvos e seria capaz de reduzir a sinalização através das vias do retinoblastoma (RB), MAP quinase (MAPK) e também AKT, participando da regulação da proliferação e sobrevivência celular.

Outro estudo também reportou uma potencial atividade supressora da proliferação, migração e invasão celular mediada pelo miR-502-3p. Neste experimento, os autores avaliaram culturas celulares de carcinomas hepatocelulares, observando que a hiperexpressão deste miRNA este associada a inibição das propriedades que conferem agressividade às células, bem como as induziu à apoptose. Este mecanismo estaria ligado à regulação da transcrição do gene SET. A proteína codificada por este gene, por sua vez, quando presente, reduz os níveis de fosfatase 2A, uma proteína regulatória do ciclo celular, da migração e apoptose (JIN et al 2016). Ainda neste tipo histológico de neoplasia, Zhi-Liang et al. (2012), citado por JIN et al. (2016, p.3881), correlacionaram a redução de expressão deste miRNA com maior risco de recorrência e maior grau histológico de Edmondson-Steiner.

Não foi encontrada na literatura uma associação entre o miR-502-3p e neoplasias hematopoiéticas, portanto o achado do presente projeto trata-se de sua primeira descrição. Os níveis deste miRNA nos casos recidivados demonstraram-se reduzidos em relação aos casos sem recidiva. Este dado

encontra-se em consonância com os estudos expostos acima, pois as evidências por eles apresentadas correlacionam a hiperexpressão deste microRNA com controle da proliferação celular e disseminação, atuando como um fator de proteção e melhor prognóstico. Inversamente, a redução de sua expressão, como a observada nos casos de LHC com recidiva, pode estar associada a uma maior agressividade biológica, por uma desregulação dos mecanismos mencionados.

#### **6.4.2.2 miR-363**

O outro microRNA que teve expressão reduzida no grupo de casos de LHC que continha todas as amostras que apresentaram recidiva foi o miR-363. Este microRNA é referido por uma série de autores como estando relacionado à inibição da proliferação celular, migração e invasão de células neoplásicas. A redução da expressão deste microRNA tem sido reportada como associada ao desenvolvimento de resistência a terapias citotóxicas. Em neoplasias linfoides, NG et al. (2011), avaliando 38 casos de linfoma de células T/NK extranodal, tipo nasal, demonstraram que o miR-363 é um dos microRNAs que se encontra hipoexpresso nestas neoplasias. Adicionalmente, os autores verificaram que a transfecção deste microRNA em células de linfoma NK em meio cultura reduziu sua capacidade proliferativa. Este estudo, entretanto, não foi capaz de propor qual seria o potencial alvo deste miRNA especificamente (NG et al. 2011).

Em carcinomas mamários, ZHANG R et al. (2014) propuseram a proteína Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1) como alvo do miR-363. Esta é uma

proteína antiapoptótica da família do Bcl-2, associada a resistência à quimioterapia em algumas neoplasias (KELLY e STRASSER 2011). No experimento de Zhang, foi observado que linhagens celulares de carcinomas mamários possuíam baixos níveis de miR-363 e altos níveis de Mcl-1. Quando estas linhagens foram transfectadas com este microRNA, houve redução significativa nos níveis de Mcl-1. Além disso, os autores demonstraram que estas linhagens celulares tornaram-se mais sensíveis à apoptose induzida pela cisplatina (ZHANG R et al. 2014). Também avaliando Mcl-1 como alvo do miR-363 e sua associação com a sensibilidade à cisplatina, OU et al. (2015) estudaram 30 amostras de carcinomas hepatocelulares e linhagens celulares resistentes à cisplatina, observando resultados semelhantes ao do estudo descrito anteriormente. Células transfectadas com miR-363 tiveram a expressão de Mcl-1 inibida, com viabilidade celular reduzida, bem como apresentaram uma diminuição na sua resistência à terapia. Esta função antiproliferativa e pró-apoptótica do miR-363 através de sua ação sobre Mcl-1 também foi comprovada por FENG et al. (2018) avaliando amostras de carcinomas de laringe.

Além de Mcl-1, outras proteínas têm sido descritas como alvo do miR-363. Em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, CHAPMAN et al. (2015) propuseram a miosina 1B, codificada pelo gene MYO1B como molécula alvejada por este miRNA. Em seu experimento, linhagens celulares transfectadas com miR-363 tiveram redução nos níveis de miosina 1B, além de diminuição da migração celular. A hiperexpressão deste microRNA foi encontrada nos casos associados ao HPV-16, quando

comparados aos casos sem associação com este vírus. Alguns dos alvos reportados do miR-363 estão relacionados à proliferação e ciclo celular. LI et al. (2015) imputaram a este miRNA um papel supressor tumoral em osteossarcoma, através da regulação de MAP2K4. Adicionalmente, este grupo correlacionou baixos níveis de expressão de miR-363 com maior tamanho tumoral, estágio clínico e metástases à distância. Em células de carcinomas hepatocelulares, YE et al. (2017) também demonstraram um efeito inibitório do miR-363 sobre o crescimento, migração e invasão, promovido pela regulação do fator de transcrição E2F3. Outro alvo descrito associado a este miRNA é o RUNX2, que juntamente com seus genes alvo RANKL e DKK1, tiveram sua expressão reduzida em células de mieloma múltiplo, quando estas tiveram seus níveis de miR-363 reconstituídos. Quando estas células foram inoculadas em ratos, houve uma redução na progressão da doença e aumento da imunidade antitumoral quando comparada ao grupo controle (GOWDA et al. 2018). Esta atividade antiproliferativa e uma ação antiangiogênica também já foi demonstrada em carcinomas de células renais, como resultado de uma ação regulatória do gene do receptor do hormônio do crescimento (GHR) pelo miR-363. Esta regulação tem a capacidade de reduzir a sinalização pela via da *Janus* tirosina-quinase 2 (via JAK2-STAT3). As células de neoplasias renais que possuíam níveis altos de miR-363 apresentaram menor quantidade de vasos capilares e menor viabilidade celular (ZHU et al. 2019).

Conforme estabelecido pelas referências mencionadas acima, de uma forma geral, o microRNA miR-363 pode ser interpretado como um supressor

tumoral, seja regulando a proliferação através do controle de fatores de transcrição e modificando vias de sinalização, ou através de um mecanismo pró-apoptótico, atuando como um sensibilizador a drogas quimioterápicas. Todos os casos de LHC recidivados avaliados no presente experimento foram enquadrados em um grupo no qual foi detectada redução da expressão deste microRNA, o que pode ter tido alguma participação relacionada ao comportamento menos indolente que estas neoplasias apresentaram.

#### **6.4.2.3 miR-886-5p**

O único microRNA que esteve diferencialmente hiperexpresso em todos os casos de LHC recidivados foi o miR-886-5p, um microRNA que tem sido pouco explorado na literatura. Ao contrário dos outros dois microRNAs que tiveram significância estatística na comparação e foram descritos acima, este microRNA tem sido relatado como estando associado à inibição da apoptose e como marcador de agressividade em neoplasias. LI et al. em 2011, foram os primeiros a descrever a associação da hiperexpressão de miR-886-5p em uma neoplasia. Estes autores estudaram amostras de carcinomas de células escamosas do colo uterino e culturas celulares destas neoplasias, todas positivas para HPV-16. De um total de 1145 microRNAs, os autores verificaram que o miR-886-5p estava altamente hiperexpresso quando comparado a tecidos normais adjacentes à neoplasia. Através da transfecção de miR-886-5p nas células em cultura, houve uma redução significativa nos níveis da proteína Bax, uma molécula pró-apoptótica



membro da família do Bcl-2 (KELLY e STRASSER 2011). Esta redução de Bax ocorreu de uma forma dose-dependente da concentração de miR-886-5p nas células transfectadas. Adicionalmente, estas células apresentaram maior atividade proliferativa, principalmente no terceiro dia após a transfecção. Inversamente, a utilização de um inibidor de miR-886-5p aumentou significativamente a proporção de células apoptóticas em relação ao grupo controle. Este experimento sugeriu que a hiper-regulação de miR-886-5p leva à redução de expressão de Bax, reduzindo a apoptose celular (LI et al. 2011).

Através da análise das interações entre microRNAs e RNAs mensageiros, SHARBATI et al. (2011) também propuseram o gene BAX como um alvo potencial de miR-886-5p, em um estudo que avaliou macrófagos humanos infectados por *Mycobacterium avium*. A infecção por esta bactéria exerceu um efeito antiapoptótico agindo sobre diversas moléculas da família do Bcl-2, elevando os níveis celulares de miR-886-5p (SHARBATI et al. 2011). Avaliando os possíveis efeitos da inibição deste microRNA, ZHANG LL et al. em 2014, demonstraram que a diminuição dos níveis de miR-886-5p em culturas celulares inibiu a formação de colônias através da indução da apoptose. Além disso, este experimento verificou uma redução nas capacidades de migração e invasividade das células tratadas com o inibidor de miR-886-5p, em comparação aos controles. Os autores propuseram que a regulação das metaloproteinases 2 e 9 (MMP2/9), bem como do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) também compõe este processo, pois detectaram níveis diminuídos destas moléculas nas

células tratadas (ZHANG LL et al. 2014).

A expressão deste microRNA também já foi associada a tumores de bexiga invasivos e de alto grau. KHOSHNEVISAN e et al. em 2015, avaliaram 70 tumores vesicais provenientes de material incluído em parafina, todos representados por carcinomas uroteliais. As neoplasias de alto grau demonstraram níveis significativamente mais elevados que os tumores de baixo grau, com um *fold change* de 2,84. Agrupamento os tumores por estadiamento patológico 'T', os autores observaram que as neoplasias músculo-invasivas ou com estadiamento mais avançado (T2 a T4) apresentaram o miR-886-5p diferencialmente hiperexpresso em relação aos tumores iniciais (Ta e T1). Com base nestes achados, os autores propõem que este microRNA pode estar envolvido em vias de sinalização relacionadas à invasão e progressão tumoral, entretanto não é possível pressupor um alvo mais específico deste microRNA com base nas análises realizadas (KHOSHNEVISAN et al. 2015).

Em neoplasias linfoides, LIU et al. (2013) descreveram pela primeira vez a associação entre a hiperexpressão de miR-886-5p e Linfomas anaplásicos de grandes células (LAGC). Neste estudo, os autores encontraram uma assinatura de 7 microRNAs diferencialmente expressos nos LAGC em comparação com Linfomas de células T angioimunoblástico e Linfomas de células T periféricas, sem outra especificação. O miR-886-5p este presente em níveis elevados tanto no LAGC ALK-positivo quanto no ALK-negativo, entretanto as maiores expressões foram observadas no grupo de neoplasias ALK-positivas. Foi realizado também um experimento com

linhagens celulares de linfomas anaplásicos, nas quais foi realizada o *knock down* de ALK; isto levou a uma redução da expressão de miR-886-5p, levantando a hipótese que um dos mecanismos que a proteína ALK pode regular a apoptose é através da regulação positiva de miR-886-5p (LIU et al. 2013). Ainda avaliando linfomas, desta vez somente linfomas de células T periféricas sem outra especificação e comparando-os com linfonodos reativos, LI et al. (2013) observaram 8 microRNAs diferencialmente hiperexpressos, dentre eles o miR-886-5p.

Em estudo recente, XIANG et al. (2019) analisaram o plasma de pacientes portadores de mieloma múltiplo e linhagens celulares em busca da expressão de miR-886-5p. Foram estudados 16 indivíduos 10 deles recém diagnosticados com mieloma e virgens de tratamento, além de 6 indivíduos saudáveis para comparação. Os autores observaram que os pacientes com mieloma apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de miR-886-5p que os controles, bem como células de mieloma múltiplo em cultura também exibiram hiperexpressão deste microRNA em comparação com mononucleares obtidos a partir do sangue periférico de pessoas não acometidas pela doença. Estes dados sugerem que este microRNA poderia ser utilizado como um biomarcador sérico no acompanhamento de pacientes com esta neoplasia.

Conforme o acima exposto, o presente estudo traz pela primeira na literatura a associação entre miR-886-5p e Linfoma de Hodgkin clássico, correlacionando sua hiperexpressão com casos que apresentaram recidiva da doença. O provável mecanismo de ação deste microRNA, referido pela

maioria das publicações, é através da inibição da apoptose mediada pela regulação negativa de Bax. Este mecanismo poderia contribuir para a proliferação celular e resistência ao tratamento com drogas citotóxicas. A investigação de moléculas da família do Bcl-2 em Linfomas de Hodgkin sempre foi motivo de investigação na literatura. Em 1996, BROUSSET et al. (1996) verificaram que 92% dos casos de LHC expressavam Bax por imunohistoquímica, com 28% expressando de uma forma forte em mais de 75% das células HRS. Mcl-1, Bcl-2 e Bcl-x também foram encontrados expressos, em 80%, 53% e 88% dos casos, respectivamente. Em contraste, LAURITZEN et al. (1999) só detectaram a expressão de Bax em 1 caso dentre 50 LHC, sendo 33 do subtipo esclerose nodular (onde foi encontrado o caso positivo) e 17 do subtipo celularidade mista (todos negativos). Um estudo subsequente, de KANAVAROS et al. publicado no ano 2000, encontrou a expressão de Bax em 41% dos casos de LHC. Esta discrepância pode ter se dado pelas diferenças de anticorpos e técnicas de imunohistoquímica empregadas pelos dois grupos à época dos experimentos.

Em uma tentativa de correlacionar a expressão de Bax com a sobrevida livre de falha, RASSIDAKIS et al. em 2002a, utilizando imunohistoquímica, não encontraram diferenças estatisticamente significativas utilizando diversos pontos de corte para avaliar a porcentagem de células com expressão desta proteína. Neste estudo, os autores encontraram positividade para Bax em 94% dos casos, achado semelhante ao descrito acima, no estudo de BROUSSET et al. (1996). Em sua discussão, é

mencionado pelos autores que os resultados contrariaram suas expectativas, pois os mesmos acreditavam que a hiperexpressão de Bax proporcionaria a apoptose induzida pela quimioterapia. Uma das possíveis explicações para este resultado seria o método de recuperação antigênica utilizado na imuno-histoquímica, através de calor, o que poderia ter alterado a conformação espacial da molécula e causado viés na reação e interpretação (RASSIDAKIS et al. 2002a). Outra possível explicação para esta ausência de correlação seria o fato da regulação da apoptose ser um mecanismo complexo, que ao invés de depender de um único fator, pode ter influência de outras proteínas envolvidas na ativação desta via de morte celular.

Este mesmo grupo, no mesmo ano, em um estudo com muitas similaridades, encontrou diferenças significativas em LHC tratados com o esquema ABVD ou equivalentes, estratificados pela expressão de Bcl-2 nas células neoplásicas. Tanto para toda a coorte quanto para pacientes em estágio I e II, a sobrevida livre de falha foi menor nos casos que houve expressão de Bcl-2 (74% vs. 84%). Na análise multivariada, segundo este estudo, a expressão de Bcl-2 manteve-se como um fator prognóstico relevante de mau prognóstico, juntamente com a idade acima de 45 anos, estágio IV, baixos níveis séricos de albumina e altos níveis séricos de DHL, estes últimos achados semelhantes aos encontrados na avaliação dos parâmetros clínico-laboratoriais do presente estudo (RASSIDAKIS et al. 2002b). Neste mesmo sentido, VASSALLO et al. (2003) também encontraram uma associação entre a expressão de Bcl-2 e o prognóstico em

LHC, propondo um índice prognóstico baseado na avaliação concomitante da expressão de Bcl-2, Mcl-1 e LMP-1.

Esta interação complexa entre as moléculas pró- e antiapoptóticas também foi apontada no estudo de BAI et al. (2007), quando os autores sugeriram a hipótese que as proteínas Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-x podem contrabalancear os efeitos pró-apoptóticos de Bax, Bad e Bim, contribuindo para a sobrevivência das células HRS. Conclusão semelhante foi obtida pelo trabalho desenvolvido por KIM et al. (2004), no qual sugere-se que a expressão e os efeitos de Bax podem ser neutralizados por outros componentes da família do Bcl-2, como Bcl-x e o próprio Bcl-2. Ainda neste contexto, utilizando imuno-histoquímica e hibridização *in situ* em TMAs contendo tecido neoplásico de LHC, GARCÍA et al. (2003) também ressaltaram que a viabilidade das células tumorais e os desfechos dos pacientes estão associados a diversos fatores, genes e suas proteínas, que compõe as vias apoptóticas, supressoras tumorais e de controle do ciclo celular.

## 6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os microRNAs diferencialmente expressos entre os casos LHC foram capazes de separar todos os casos que apresentaram recidivas. Eles estão associados ao controle da proliferação celular, invasividade, migração ou regulação da apoptose. Sugere-se que este perfil de maior expressão de miR-886-5p e redução de expressão de miR-363 e miR-502-3p possa

predizer casos com comportamento menos indolente e com maior risco de recorrência. Dos 13 casos que apresentaram este perfil, 9 eram casos com recorrência (69%), enquanto que os 6 casos que tiveram o perfil oposto não apresentaram recidiva do LHC após a terapia inicial.

Este resultado pode ter tido a influência do viés de seleção das amostras, pois foram deliberadamente escolhidos casos com e sem recidivas em uma proporção equivalente, todos do subtipo esclerose nodular e sem associação com o EBV. Esta pré-seleção foi realizada no intuito de normalizar uma parte das variáveis e favorecer o encontro de um ou um grupo de microRNAs que possivelmente estejam associados de fato à presença recidiva e não sejam decorrentes de outros fatores, o que se sugere que tenha sido alcançado. Adicionalmente, o número de casos testados foi pequeno e a proporção de casos recidivados incluídos no experimento dos microRNAs foi maior do que a reportada na literatura e que a encontrada na própria coorte como um todo.

Ainda assim, pela primeira vez, descrevem-se aqui uma série de microRNAs que ainda não tinham sido associados ao LHC, com atenção especial àqueles diferencialmente expressos. Estes, mais uma vez, no âmbito da investigação de fatores prognósticos em LHC, trazem à tona a temática do ciclo celular e especialmente do controle da apoptose, assuntos recorrentes no que tange esta neoplasia, entretanto, agora não somente em relação a genes e proteínas, mais no controle epigenético mediado pelos microRNAs. Tanto os interessantes achados quanto as eventuais limitações do presente estudo servem de alicerce e motivação para a continuidade da

investigação destes novos biomarcadores, com casuísticas alargadas, eventualmente prospectivas e preferencialmente integrando as metodologias de expressão protéica e de microRNAs. Desta forma, os mecanismos acima mencionados de proliferação e sobrevivência celular dos Linfomas de Hodgkin clássico podem ser revisitados sob uma nova ótica, com o intuito de identificar quais são os pacientes, nessa doença que em geral possui bom prognóstico, que podem estar sob maior risco de refratariedade, recidiva e óbito.



## **7 CONCLUSÃO**

A coorte de pacientes com LHC do presente estudo apresenta características clínicas e patológicas semelhante à da literatura. Há predomínio de pacientes jovens, com apresentação inicial em estágio I e II. A maioria dos casos possuía o subtipo esclerose nodular e foi tratada com esquema ABVD. O padrão de expressão dos anticorpos e frequência de positividade para o EBV também não diferiram de dados previamente publicados.

Os marcadores imuno-histoquímicos avaliados não demonstraram associação com prognóstico em análise multivariada. Nesta, apenas fatores clínicos (idade e estágio) e laboratoriais (níveis de albumina e DHL) constituíram-se como fatores relevantes.

Os LHC possuem um perfil de expressão de microRNA distinto de linfonodos reativos, independente do padrão de reatividade. O microRNA miR-886-5p esteve diferencialmente expresso e, seus níveis elevados, em associação com níveis reduzidos de miR-502-3p e miR-363, foram capazes de identificar um grupo de LHC que continha todos os casos com recidivas. O outro grupo foi composto somente por casos de pacientes livres da doença. Estes microRNAs devem ser avaliados em coortes mais amplas para validação destes achados.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. **Blood** 2000; 96:1889-99.

Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. **N Engl J Med** 2015; 372:311-9.

Armand P, Shipp MA, Ribrag V, et al. Programmed death-1 blockade with pembrolizumab in patients with classical Hodgkin Lymphoma after brentuximab vedotin failure. **J Clin Oncol** 2016; 34:3733-9.

Bai M, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Grepì C, Agnantis NJ, Kanavaros P. Expression of bcl2 family proteins and active caspase 3 in classical Hodgkin's lymphomas. **Hum Pathol** 2007; 38:103-13.

Bjaanæs MM, Halvorsen AR, Solberg S, et al. Unique microRNA-profiles in EGFR-mutated lung adenocarcinomas. **Int J Cancer** 2014; 135:1812-21.

Brousset P, Benharroch D, Krajewski S, et al. Frequent expression of the cell death-inducing gene Bax in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Blood** 1996; 87:2470-5.

Campos AHJFM, Moreira A, Ribeiro KB, et al. Frequency of EBV associated classical Hodgkin lymphoma decreases over a 54-year period in a Brazilian population. **Sci Rep** 2018; 8:1849.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. **Nature** 2014; 513:202-9.

Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. **Cancer Res** 1971; 31:1860-1.

Chapman BV, Wald AI, Akhtar P, et al. MicroRNA-363 targets myosin 1B to reduce cellular migration in head and neck cancer. **BMC Cancer** 2015; 15:861.

Chen T, Ren H, Thakur A, Yang T, Li Y, Zhang S, et al. miR-382 inhibits tumor progression by targeting SETD8 in non-small cell lung cancer. **Biomed Pharmacother** 2017; 86:248-53.

Chen D, Zhang Y, Lin Y, Shen F, Zhang Z, Zhou J. MicroRNA-382 inhibits cancer cell growth and metastasis in NSCLC via targeting LMO3. **Exp Ther Med** 2019; 17:2417-24.

Cheng CK, Kwan TK, Cheung CY, et al. A polymorphism in the 3'-untranslated region of the NPM1 gene causes illegitimate regulation by microRNA-337-5p and correlates with adverse outcome in acute myeloid leukemia. **Haematologica** 2013; 98:913-7.

Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. **J Clin Oncol** 2014; 32:3059-68.

Connors JM, Jurczak W, Straus DJ, et al. Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. **N Engl J Med** 2018; 378:331-44.

Cordeiro A, Monzó M, Navarro A. Non-Coding RNAs in Hodgkin Lymphoma. **Int J Mol Sci** 2017; 18:E1154.

Dhiab MB, Ziadi S, Ksaa F, et al. Methylation of miR124a-1, miR124a-2, and miR124a-3 in Hodgkin lymphoma. **Tumor Biol** 2015; 36:1963-71.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:259-69.

Fang Y, Xie T, Xue N, et al. miR-382 contributes to renal tubulointerstitial fibrosis by downregulating HSPD1. **Oxid Med Cell Longev** 2017; 2017:4708516.

Feng J, Qi B, Guo L, Chen LY, Wei XF, Liu YZ, et al. miR-382 functions as a tumor suppressor against esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol** 2017; 23:4243-51.

Feng WT, Yao R, Xu LJ, et al. Effect of miR-363 on the proliferation, invasion and apoptosis of laryngeal cancer by targeting Mcl-1. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2018; 22:4564-72.

Forteza-Vila J, Fraga M. Differential diagnosis of classic Hodgkin lymphoma. **Int J Surg Pathol** 2010; 18(3 Suppl):124S-7S.

García JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. **Blood** 2003; 101:681-9.

Geller SA, Taylor CR. Thomas Hodgkin: the "man" and "his disease": *humani nihil a se alienum putabit* (nothing human was foreign to him). **Virchows Arch** 2013; 463:353-65.

Gibcus JH, Tan LP, Harms G, et al. Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. **Neoplasia** 2009; 11:167-76.

Gowda PS, Wildman BJ, Trotter TN, et al. Runx2 Suppression by miR-342 and miR-363 Inhibits Multiple Myeloma Progression. **Mol Cancer Res** 2018; 16:1138-48.

Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs. **Virology** 2011; 411:325-343.

Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, et al. High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. **Am J Pathol** 1990; 137:13-8.

Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, et al. Epstein-Barr vírus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Proc Natl Acad Sei U S A** 1991; 88:4766-70.

Hoppe RT, Advani RH, Ai WZ, et al. NCCN Guidelines Insights: Hodgkin Lymphoma, Version 1.2018. **J Natl Compr Canc Netw** 2018; 16:245-254.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2016: cancer stat facts: Hodgkin Lymphoma**. National Cancer Institute. Bethesda, MD. Available from: <URL:<https://bit.ly/2GOFL4I>> [2019 fev 14]

Hu B, Yang Z, Yu L, et al. 3D Hypoxia Microenvironment Created by a Single Cell Layer-by-Layer Assembly Spheroid Demonstrates the Role of miR-382 and Cell Autophagy in Renal Fibrosis. **J Biomed Nanotechnol** 2018; 14:331-43.

Hu R, Kagele DA, Huffaker TB, et al. miR-155 promotes T follicular helper cell accumulation during chronic, low-grade inflammation. **Immunity** 2014; 41:605-19.

Huang X, Zhou X, Wang Z, et al. CD99 triggers upregulation of miR-9-modulated PRDM1/BLIMP1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells and induces redifferentiation. **Int J Cancer** 2012; 131:E382-E94.

Inada K, Okoshi Y, Cho-Isoda Y, et al. Endogenous reference RNAs for microRNA quantitation in formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node tissue. **Sci Rep** 2018; 8:5918.

Iwakiri D. Epstein-Barr virus-encoded RNAs: key molecules in viral pathogenesis. **Cancers** 2014; 6:1615-30.

Jin H, Yu M, Lin Y, et al. MiR-502-3P suppresses cell proliferation, migration, and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting SET. **Onco Targets Ther** 2016; 9:3281-9.

Joerger M, Baty F, Früh M, et al. Circulating microRNA profiling in patients with advanced non-squamous NSCLC receiving bevacizumab/erlotinib followed by platinum-based chemotherapy at progression (SAKK 19/05). **Lung Cancer** 2014; 85:306-13.

Johnson PCD, McAulay KA, Montgomery D, et al. Modeling HLA associations with EBV-positive and -negative Hodgkin lymphoma suggests distinct mechanisms in disease pathogenesis. **Int J Cancer** 2015; 137:1066-75.

Jones K, Nourse JP, Keane C, Bhatnagar A, Gandhi MK. Plasma microRNA are disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. **Clin Cancer Res** 2014; 20:253-64.

Kanavaros P, Stefanaki K, Vlachonikolis J, et al. Expression of p53, p21/waf1, bcl-2, bax, Rb and Ki67 proteins in Hodgkin's lymphomas. **Histol Histopathol** 2000; 15:445-53.

Kelly PN, Strasser A. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. **Cell Death Differ** 2011; 18:1414-24.

Khoshnevisan A, Parvin M, Ghorbanmehr N, et al. A significant upregulation of miR-886-5p in high grade and invasive bladder tumors. **Urol J** 2015; 12:2160-4.

Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. **Histopathology** 2004; 44:257-67.

Kim SH, Shin YK, Lee IS, et al. Viral latent membrane protein 1 (LMP-1)-induced CD99 down-regulation in B cells leads to the generation of cells with Hodgkin's and Reed-Sternberg phenotype. **Blood** 2000, 95:294-300.

Klinke O, Feederle R, Delecluse H. Genetics of Epstein-Barr virus microRNAs. **Semin Cancer Biol** 2014; 26:52-9.

Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. **J Pathol** 2005; 207:243-9.

Kriegel AJ, Liu Y, Cohen B, Usa K, Liu Y, Liang M. MiR-382 targeting of kallikrein 5 contributes to renal inner medullary interstitial fibrosis. **Physiol Genomics** 2012; 44:259-67.

Lal A, Kim HH, Abdelmohsen K, et al. p16(INK4a) translation suppressed by miR-24. **PLoS One** 2008; 3:e1864.

Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E, et al. miR-24. Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. **Mol Cell** 2009; 35:610-25.

Lauritzen AF, Møller PH, Nedergaard T, Guldborg P, Hou-Jensen K, Ralfkiaer E. Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin's disease. **APMIS** 1999; 107:636-44.

Li JH, Xiao X, Zhang YN, et al. MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells. **Gynecol Oncol** 2011; 120:145-51.

Li M, Lü N, Liu HX, Chen DB, Zhang JZ. Expression profiling of microRNA and their target genes in peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi** 2013; 42:519-24.

Li X, Liu X, Fang J, Li H, Chen J. microRNA-363 plays a tumor suppressive role in osteosarcoma by directly targeting MAP2K4. **Int J Clin Exp Med** 2015; 8:20157-67.

Lin CA, Duan KY, Wang XW, Zhang ZS. Study on the role of Hsa-miR-382-5p in epidural fibrosis. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2018; 22:3663-8.

Liu C, Iqbal J, Teruya-Feldstein J, et al. MicroRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. **Blood** 2013; 122:2083-92.



Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. **J Clin Oncol** 1989; 7:1630-6.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States 1992-2001. **Blood** 2006; 107:265-76.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Hodgkin Lymphoma, Version 1.2019**. Available from: <URL: <https://bit.ly/33c7DsV>>. [2019 jan 15]

Navarro A, Gaya A, Martinez A, et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. **Blood** 2008; 111:2825-2831.

Navarro A, Diaz T, Martinez A, et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. **Blood** 2009; 114:2945-51.

Ng SB, Yan J, Huang G, et al. Dysregulated microRNAs affect pathways and targets of biologic relevance in nasal-type natural killer/T-cell lymphoma. **Blood** 2011; 118:4919-29.

Nie K, Gomez M, Landgraf P, et al. MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. **Am J Pathol** 2008; 173:242-52.

Ning MS, Kim AS, Prasad N, Levy SE, Zhang H, Andl T. Characterization of the Merkel cell carcinoma miRNome. **J Skin Cancer** 2014; 2014:289548.

Ou Y, Zhai D, Wu N, Li X. Downregulation of miR-363 increases drug resistance in cisplatin-treated HepG2 by dysregulating Mcl-1. **Gene** 2015; 572:116-22.

Paydas S, Acikalin A, Ergin M, Celik H, Yavuz B, Tanriverdi K. Micro-RNA (miRNA) profile in Hodgkin lymphoma: association between clinical and pathological variables. **Med Oncol** 2016; 33:34.

Piña-Oviedo S, Moran CA. Primary Mediastinal Classical Hodgkin Lymphoma. **Adv Anat Pathol** 2016; 23:285-309.

Qi B, Lu JG, Yao WJ, et al. Down regulation of microRNA-382 is associated with poor outcome of esophageal squamous cell carcinoma. **World J Gastroenterol** 2015; 21:6884-91.

Rassidakis GZ, Medeiros LJ, McDonnell TJ, et al. BAX expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: correlation with clinical outcome. **Clin Cancer Res** 2002; 8:488-93.

Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. **Blood** 2002; 100:3935-41.

Ren Y, Zhang H, Jiang P. MicroRNA-382 inhibits cell growth and migration in colorectal cancer by targeting SP1. **Biol Res** 2018; 51:51.

Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, et al. MicroRNA signatures and treatment response in patients with advanced classical Hodgkin lymphoma. **Br J Hematol** 2013; 162:336-47.

Shaffer A, Lin KI, Kuo TC, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. **Immunity** 2002 17:51-62.

Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin lymphoma: a review and update on recent progress. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:116-32.

Sharbati J, Lewin A, Kutz-Lohroff B, Kamal E, Einspanier R, Sharbati S. Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon Mycobacterium avium subsp. hominissuis infection. **PLoS One** 2011; 6:e20258.

Subat S, Inamura K, Ninomiya H, Nagano H, Okumura S, Ishikawa Y. Unique MicroRNA and mRNA Interactions in EGFR-mutated lung adenocarcinoma. **J Clin Med** 2018; 7:419.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. IARC: Lyon 2017. (WHO Classification of Tumours, Revised 4<sup>th</sup> Edition, Volume 2).

Tian ZG, Zhuang Y, Jin Z, Zhou F, Zhu LF, Shen PC. MicroRNA-337-5p participates in the development and progression of osteosarcoma via ERBB, MAPK and VEGF pathways. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2018; 22:5460-70.

Vassallo J, Metze K, Traina F, de Souza CA, Lorand-Metze I. The prognostic relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma** 2003; 44:483-8.

Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. **Br J Haematol** 2014; 165:287-99.

Vlierberghe PV, De Weer A, Mestdagh P, et al. Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77+ B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs. **Br J Hematol** 2009; 147:686-90.

Vockerodt M, Cader FZ, Shannon-Lowe C, Murray P. Epstein-Barr virus and the origin of Hodgkin lymphoma. **Chin J Cancer** 2014; 33:591-7.

Vockerodt M, Yap L, Shannon-Lowe C, Curley H, et al. The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. **J Pathol** 2015; 235:312-22.

Weiss LM, O'Malley D. Benign lymphadenopathies. **Mod Pathol** 2013; 26 Suppl 1:S88-96.

Westra WH, Lewis JS Jr. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of head and neck tumours: oropharynx. **Head Neck Pathol** 2017; 11:41-7.

Xiang P, Liu Y, Liu L, Lin Q, et al. The Biological Function and Clinical Significance of miR-886-5p in Multiple Myeloma. **Acta Haematol** 2019; 4:1-9.

Yao H, Xia D, Li ZL, et al. MiR-382 functions as tumor suppressor and chemosensitizer in colorectal cancer. **Biosci Rep** 2019 39:BSR20180441.

Ye J, Zhang W, Liu S, Liu Y, Liu K. miR-363 inhibits the growth, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by regulating E2F3. **Oncol Rep** 2017; 38:3677-84.

Zhang LL, Wu J, Liu Q, Zhang Y, Sun ZL, Jing H. MiR-886-5p inhibition inhibits growth and induces apoptosis of MCF7 cells. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:1511-5.

Zhang R, Li Y, Dong X, Peng L, Nie X. MiR-363 sensitizes cisplatin-induced apoptosis targeting in Mcl-1 in breast cancer. **Med Oncol** 2014; 31:347.

Zhang W, Liu J, Qiu J, et al. MicroRNA-382 inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis through targeting COUP-TFII. **Oncol Rep** 2016; 36:3707-15.

Zhang S, Ge W, Zou G, et al. MiR-382 targets GOLM1 to inhibit metastasis of hepatocellular carcinoma and its down-regulation predicts a poor survival. **Am J Cancer Res** 2018; 8:120-31.

Zhu J, Zhu DQ, Zhang Y, et al. MicroRNA-363 inhibits angiogenesis, proliferation, invasion, and migration of renal cell carcinoma via inactivation of the Janus tyrosine kinases 2-signal transducers and activators of transcription 3 axis by suppressing growth hormone receptor gene. **J Cell Physiol** 2019; 234:2581-92.

## Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo Cancer Center**  
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA  
EM PESQUISA - CEP

### APROVAÇÃO

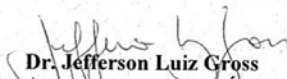
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **22/05/2018**, **aprovaram** a realização do projeto nº. **2528/18** intitulado: "**Comparação entre os perfis de expressão de microRNA em Linfomas de Hodgkin clássico.**"

**Pesquisador responsável:** Fernando Augusto Soares  
**Aluno:** Felipe D'Almeida Costa (Doutorado)

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).**

São Paulo, 28 de maio de 2018.

Atenciosamente,

  
Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1