

**ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL E DA
INFECÇÃO PELO EBV NO LINFOMA DE HODGKIN
CLÁSSICO NO NORDESTE E SUDESTE BRASILEIRO**

**MARIA DO PATROCINIO FERREIRA
GRANGEIRO BECO**

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. José Vassallo

Co-Orientadora: Dra. Maria da Silva Pitombeira

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Beco, Maria do Patrocinio Ferreira Grangeiro

Estudo do microambiente tumoral e da infecção pelo EBV no Linfoma de Hodgkin clássico no Nordeste e Sudeste brasileiro / Maria do Patrocinio Ferreira Grangeiro Beco – São Paulo, 2019.

99p.

Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: José Vassallo

Descritores: 1. Doença de Hodgkin/Hodgkin Disease. 2. Microambiente Tumoral/Tumor Microenvironment. 3. Infecções por Vírus Epstein-Barr/ Epstein-Barr Virus Infections. 4. Linfócitos B/B-Lymphocytes. 5. Linfócitos T Citotóxicos/T-Lymphocytes, Cytotoxic

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre”.

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

A meus filhos, Mateus e Beatriz, donos do meu amor incondicional, os maiores presentes de Deus para minha vida.

A minha mãe, Luiza Maria, por todo amor e dedicação, o porto seguro para o qual sempre me volto quando necessário.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. professor José Vassallo, exemplo de patologista e pesquisador, por todo apoio e paciência ao longo da elaboração do meu projeto final.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares, grande incentivador dos patologistas, pelo empenho dedicado ao meu projeto.

Um agradecimento especial a Dra. Helena Pitombeira, fonte de admiração desde a graduação, que durante este projeto foi muito mais que co-orientadora: amiga, incentivadora e torcedora, ensinando-me pacientemente a trilhar o tortuoso caminho da pesquisa no Brasil.

Para minhas irmãs amadas, que sempre me motivaram, entenderam as minhas ausências e momentos de reclusão.

Ao meu esposo, pela dedicação a nossa família, principalmente nos períodos que tive que me afastar para as aulas da pós-graduação, as viagens e os finais de semana em que foi necessário cancelar o lazer da família para poder escrever.

As minhas amigas queridas, Eudócia, Yara e Tércia, minhas irmãs de coração.

Um agradecimento especial a minha amiga Sandra Eugênia, que partiu mais cedo e deixou um legado de amor e caridade.

Ao professor Manfredo Lins, que me estimulou a começar a frequentar as aulas do DINTER como ouvinte.

Ao professor Marcos Venicio Alves Lima por toda dedicação a pesquisa dentro do Instituto do Câncer do Ceará.

A todos os patologistas do departamento de patologia do HHJ, em especial ao Carlos Hirth, que me ajudou na avaliação das lâminas e deu sugestões preciosas para análise estatística.

Ao Dr. Felipe D'Almeida Costa, do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center pela ajuda ao acesso aos blocos de parafina e prontuários dos pacientes da instituição.

Aos amigos e colegas do HEMOCE por toda torcida e paciências nas minhas ausências.

Aos amigos e tutores do grupo Minicoelhos Fortal, por alegrarem meus dias com tanto amor, solidariedade, muitas imagens fofas e muitos, muitos risos.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia, Imunoistoquímica e TMA do A.C.Camargo Cancer Center, em especial o Severino (Seven), Laís e Renata, pela dedicação na confecção dos TMA e realização das reações de imunoistoquímica.

Ao Nilson, pelo resgate de lâminas e blocos do arquivo de blocos e lâminas do Hospital Haroldo Juaçaba.

Aos funcionários do SAME do HHJ, que conseguiram localizar todos os prontuários, inclusive os do arquivo morto.

RESUMO

Beco MPFG. **Estudo do microambiente tumoral e da infecção pelo EBV no Linfoma de Hodgkin clássico no Nordeste e Sudeste brasileiro.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O linfoma de Hodgkin é uma neoplasia singular, caracterizada pela escassez de células tumorais, imersas em abundante microambiente inflamatório. Com base nas diferenças histológicas e no fenótipo das células tumorais, divide-se em duas entidades: o linfoma de Hodgkin clássico e o linfoma de Hodgkin predominância linfocitária nodular. A incidência do linfoma de Hodgkin varia de acordo com idade, nível socioeconômico e associação com o vírus EBV. Existem estudos que associam a composição do microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin com prognóstico, particularmente o alto índice de macrófagos no microambiente tumoral a pior prognóstico. No Brasil, os estudos publicados foram discordantes com os demais estudos. O presente estudo propõe avaliar a interação entre o linfoma de Hodgkin e seu microambiente, em busca de marcadores prognósticos no infiltrado inflamatório peritumoral, bem como avaliar as diferenças entre a região Sudeste, de melhor nível socioeconômico e a região Nordeste, que tem índice socioeconômico mais baixo. Para tanto, foram identificados retrospectivamente 176 pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássico, entre 2003 e 2013, provenientes de dois centros oncológicos de referência: o AC Camargo Cancer Center (região Sudeste) e Hospital Haroldo Juaçaba (região Nordeste). A média de idade foi 35 ± 16 anos, sendo 39 ± 15 nos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center e 30 ± 17 nos pacientes do HHJ ($p<0,001$). O LHEN foi o subtipo mais frequente, correspondendo a 89,9% dos casos do A.C.Camargo Cancer Center e 63,2% dos casos do HHJ. Positividade para EBV foi vista em 9,2% dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center e em 35,6% dos pacientes do HHJ. Os pacientes do HHJ apresentaram um microambiente tumoral com maior número células

expressando CD 3, CD 4 e CD 8. Para ambas as populações, os linfomas associados a positividade para EBV apresentaram maior número de células CD 8 no microambiente. Para os pacientes do A.C.Camargo Cancer Center o microambiente não influenciou SLE. Para os pacientes do HHJ, na análise univariada um maior percentual de células expressando CD 20 no microambiente mostrou associação com maior SLE. Na análise multivariada, alta expressão de CD 20 mostrou ser fator independente associado a maior SLE. Macrófagos associados ao tumor não mostraram associação com pior prognóstico, quando avaliados por CD68.

Palavras-chave: Linfoma de Hodgkin. Microambiente Tumoral. Infecções por Vírus Epstein-Barr. Linfócitos B. Linfócitos T citotóxicos.

SUMMARY

Beco MPFG. **A tumoral microenvironment and EBV infection study in classic Hodgkin Lymphoma in Northeastern and Southeastern Brazil.** São Paulo; 2019. [Dissertação de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Hodgkin's lymphoma (HL) is a unique neoplasm, characterized by the scarcity of tumor cells which are immersed in an abundant inflammatory microenvironment. Based on histologic and phenotypic differences in tumor cells, HL is divided in two entities: classic Hodgkin's lymphoma (cHL) and nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. HL incidence varies upon age, socioeconomic level and EBV association. In addition, some studies have associated tumor microenvironment (TME) features in HL with prognosis, specially a high number of tumor associated macrophages as an adverse prognosis marker. In Brazil, the published studies are not in accordance to the international data. In this study, we evaluated HL interaction with TME and we compared populations from two different geographic regions: Brazilian Southeast, with higher socioeconomic level, and Northeast Brazil with lower socioeconomic level. 176 patients previously diagnosed with cHL from 2003 to 2013 from two referral oncologic centers (A. C. Camargo Cancer Center (AC) – Southeast Brazil and Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ) – Northeast Brazil) were included in this study. The global median age was 35 ± 16 , which comprises a median of 30 ± 17 for HHJ patients and 39 ± 15 for AC patients ($p < 0.001$). Nodular sclerosi HL was the most frequent subtype, comprising 89.9% and 63.2% of AC and HHJ cases, respectively. EBV positivity was detected in 9.2% of AC patients and in 35.6% of HHJ patients. Patients from the HHJ presented a higher expression of CD3, CD4 and CD8 in the TME. In both populations, EBV-associated lymphoma were associated to a higher CD8 detection in the TME. Event-free survival (EFS) was not influenced by TME constitution in the AC patients. On the other hand, considering HHJ patients, univariate analysis showed an association between a longer EFS to high CD20

expression. In multivariate analysis, high CD20 expression showed to be an independent prognostic factor related to a longer EFS. Tumor associated macrophages showed no association to prognosis when evaluated by CD68 expression.

Key words: Hodgkin's lymphoma, tumoral microenvironment, Epstein-Barr Virus, prognosis, CISH, tumor associated macrophages, B lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais vias de sinalização das células de HRS	21
Figura 2	Interações da célula de HRS do LHc com as células do microambiente	32
Figura 3	Fluxograma da seleção dos pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba	43
Figura 4	Fluxograma da seleção dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center.....	44
Figura 5	Exemplos representativos da imunoexpressão dos anticorpos analisados no LHc, avaliados por microscopia óptica com magnitude de 400x	48
Figura 6	Exemplo da avaliação do CISH para EBV.....	49
Figura 7	Mediana do percentual de linfócitos e macrófagos avaliados por estimativa visual no microambiente tumoral do LHc	59
Figura 8	Mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHc em dois centros oncológicos	61
Figura 9	Correlação entre o status do EBV e mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHc em dois centros oncológicos	67

Figura 10	Correlação entre o status do EBV e mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHc no A.C.Camargo Cancer Center	68
Figura 11	Correlação entre o status do EBV e mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHc no HHJ.....	69
Figura 12	Curva de sobrevida global avaliada em 36 meses em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo dos critérios de CHENSON para avaliação da resposta ao tratamento no linfoma.....	16
Tabela 2	Anticorpos primários utilizados para as reações imunoistoquímicas.....	45
Tabela 3	Sumário dos dados clínicos e histopatológicos de pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos no Brasil	53
Tabela 4	Sumário dos dados laboratoriais e conduta terapêutica de pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos no Brasil	54
Tabela 5	Avaliação da resposta terapêutica em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos no Brasil	55
Tabela 6	Correlação entre parâmetros clínicos e SLE em pacientes portadores de LHc no A.C.Camargo Cancer Center	55
Tabela 7	Correlação entre parâmetros clínicos e sobrevida livre de eventos em pacientes portadores de LHc no HHJ	56
Tabela 8	Correlação entre parâmetros laboratoriais, conduta terapêutica e sobrevida livre de eventos em pacientes portadores de LHc no A.C.Camargo Cancer Center	57
Tabela 9	Correlação entre parâmetros laboratoriais, conduta terapêutica e sobrevida livre de eventos em pacientes portadores de LHc no HHJ.....	58

Tabela 10	Sumário do percentual de linfócitos e macrófagos avaliados por estimativa visual no microambiente tumoral do LHc em dois centros oncológicos.....	60
Tabela 11	Correlação entre o percentual de linfócitos e macrófagos no microambiente tumoral do LHc e sobrevida livre de evento no A.C.Camargo Cancer Center	62
Tabela 12	Correlação entre o percentual de linfócitos e macrófagos no microambiente tumoral do LHc e sobrevida livre de evento no HHJ	63
Tabela 13	Positividade para EBV avaliada por CISH em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos	64
Tabela 14	Correlação entre parâmetros clínicos e o status de EBV em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos...	65
Tabela 15	Correlação entre parâmetros laboratoriais e o status de EBV em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos	66
Tabela 16	Correlação entre SLE e o status de EBV em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos	70
Tabela 17	Análise multivariada de fatores preditivos de SLE em pacientes portadores de LHc no A.C.Camargo Cancer Center.....	70
Tabela 18	Análise multivariada de fatores preditivos de SLE em pacientes portadores de LHc no HHJ	71

Tabela 19	Sobrevida livre de eventos avaliada em 36 meses em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos...	71
Tabela 20	Sobrevida global avaliada em 36 meses em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABVD	Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina
AP1	Activator protein 1
BART	<i>BamHI A rightward transcripts</i>
BCR	Recetor das células B
BEACOPP	Bleomicina, Etoposido, Doxorubicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina, Prednisolona
BMO	Biópsia de Medula Óssea
BOB1	<i>B-cell specific octamer-binding protein 1</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCL17/TARC	<i>Chemokine (C-C motif) ligand/Thymus and activation-regulated chemokine</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CG	Centro germinativo
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
LHc	Linfoma de Hodgkin clássico
Cru	Complete Remission Unconfirmed
CSF	Colony stimulating Fator
DAB	Diaminobenzidine
DAP	Departamento de Anatomia Patológica
EBER	<i>Epstein-Barr encoded ribonucleic acids</i>
EBNA1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
EBV	vírus <i>Epstein-Barr</i>
FLIP	<i>FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme (FLICE) inhibitory protein</i>
Fox P3	Forkhead Box P3
GM-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos e monócitos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HHJ	Hospital Haroldo Juaçaba
HLA	Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)

HRS	Células de Hodgkin e Reed-Sternberg
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
Ig	Imunoglobulina
IgV	Região variável da IgHQ
IL	Interleucina
JAK-STAT	<i>Janus kinase–signal transducers and activators of transcription</i>
LH	Linfoma de Hodgkin
LHCM	Linfoma de Hodgkin Celularidade Mista
LHDL	Linfoma de Hodgkin Depleção linfocitária
LHEN	Linfoma de Hodgkin Esclerose Nodular
LHPLN	Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocitária Nodular
LHRL	Linfoma de Hodgkin Rico em Linfócitos
LMP	<i>Latent membrane protein</i>
LNH	Linfoma não-Hodgkin
M-CSF	Macrophages-Colony stimulating Fator
MHC	Major Histocompatibility Complex (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
MUM 1	Multiple Myeloma 1
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NK	Natural killer
NOTCH-1	Notch Homolog 1, Translocation-Associated
Oct2	Organic Cation Transporter Gene
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAX 5	<i>Paired Box</i> (gene que codifica proteína ativadora de linhagem de célula B)
PCR	Proteína C Reativa
PD	Progressão de doença
PD1	Programmed Death-1
PDL1	Programmed Death Ligand-1
PDL2	Programmed Death Ligand-2
PET-CT	Tomografia por Emissão de Pósitrons acoplada à tomografia computadorizada

PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RC	Resposta completa
RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Resposta parcial
SLE	Sobrevida livre de eventos
SG	Sobrevida global
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TAM	Tumor-Associated Macrophages
TC	Tomografia computadorizada
TCR	Recetor das células T
TGFβ	Transforming growth factor β
Th	Linfócitos T auxiliares
TMA	Tissue microarray
TNF	Tumor Necrosis Factor
Treg	Linfócitos T reguladores
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Aspectos Históricos do Linfoma de Hodgkin	3
2.2	Epidemiologia do Linfoma de Hodgkin	4
2.3	Classificação do Linfoma de Hodgkin.....	9
2.4	Subtipos Histológicos do Linfoma de Hodgkin.....	10
2.5	Imunofenótipo do Linfoma de Hodgkin	12
2.6	Estadiamento do Linfoma de Hodgkin	13
2.7	Patologia e Biologia do Linfoma de Hodgkin	18
2.7.1	Origem das células HRS	18
2.7.2	Desregulação dos fatores de transcrição e sinalização.....	19
2.7.3	Lesões genéticas.....	23
2.7.4	Papel do EBV na patogênese do Linfoma de Hodgkin	25
2.7.5	Interação com o microambiente tumoral.....	29
3	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	37
4	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivo Geral.....	40
4.2	Objetivos Específicos	40
5	METODOLOGIA	41
5.1	Considerações Éticas	41
5.2	Características do Estudo.....	41
5.3	População do Estudo	41
5.3.1	Critérios de Inclusão	42
5.3.2	Critérios de Exclusão.....	42
5.4	Resgate de Lâminas e Blocos de Parafina.....	42

5.5	Fluxograma de Seleção dos Pacientes do A.C.Camargo Cancer Center.....	43
5.6	Fluxograma de Seleção dos Pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza.....	44
5.7	Confecção do <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	45
5.8	Realização da Imunoistoquímica.....	45
5.9	Hibridização <i>In Situ</i> Cromogênica (CISH) para detecção do vírus de Epstein-Barr.....	47
5.10	Análise das Reações Imunoistoquímicas do TMA.....	47
5.11	Análise do CISH para EBV.....	48
5.12	Análise Estatística.....	49
5.12.1	Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevidas.....	49
5.12.2	Tabulação de dados e testes estatísticos.....	50
6	RESULTADOS.....	52
6.1	Características Clínicas.....	52
6.2	Características do Microambiente Tumoral.....	59
6.3	Status do EBV.....	64
6.4	Fatores Preditivos e Sobrevida.....	70
7	DISCUSSÃO.....	73
7.1	Achados Clínicos e Epidemiológicos.....	73
7.2	Achados do Microambiente Tumoral.....	76
8	CONCLUSÃO.....	85
9	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	86
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

ANEXO/APÊNDICE

Anexo 1 Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 1 Formulário de Coleta de Dados Clínicos

1 INTRODUÇÃO

Linfomas são neoplasias malignas do sistema linfo-hematopoiético e constituem um grupo heterogêneo de entidades que diferem na apresentação clínica, morfologia, imunofenótipo e alterações genéticas (HUH 2012). Os linfomas são divididos em dois grandes grupos: Linfomas não Hodgkin (neoplasias de células linfóides B e T/NK) e Linfomas de Hodgkin (LH, divididos em dois grandes grupos, os do tipo predominância linfocitária nodular e os clássicos). Há dezenas de subtipos diferentes de linfomas, o que reflete a complexidade do sistema linfoide (ROMAN e SMITH 2011). Em 2018, foram responsáveis por 3,2% dos novos casos de câncer do mundo, sendo que 2,8% corresponderam a linfomas não Hodgkin e 0,4% a linfomas de Hodgkin (BRAY et al. 2018).

A classificação dos linfomas tem um longo histórico de controvérsias, com várias nomenclaturas utilizadas regionalmente e nem sempre correspondendo à biologia da célula tumoral. Mais uma vez, este fato foi decorrente da complexidade do sistema imune e de seu conhecimento mais limitado que o atual. Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma nomenclatura de consenso, definindo as neoplasias hematológicas com base nos aspectos clínicos, morfologia, imunofenótipo e anormalidades genéticas (CHAN 2001). A partir de então, as entidades não foram apenas definidas por um de seus aspectos, como, por exemplo, o morfológico, porém levando em conta o conjunto de todos esses dados. A

nomenclatura foi atualizada em 2008 e 2016, com inclusão ou retirada de entidades de acordo com a sua reprodutibilidade diagnóstica, individualização biológica e relevância clínica (CAMPO et al. 2011; SWERDLOW et al. 2016).

Dentro desse grupo de neoplasias, os linfomas de Hodgkin clássicos (LHc) foram dos últimos a ter sua histogênese desvendada, quando foi demonstrado que a quase totalidade corresponde a neoplasias de células linfoides B com características particulares (KÜPPERS 2009; 2012). Outras características peculiares aos LHc incluem aspectos clínicos, como progressão por contiguidade e quase ausência de doença extranodal primária, e morfológicos, como a presença de intenso infiltrado inflamatório acompanhando as células neoplásicas. Uma vez que nas últimas décadas o estudo do microambiente tumoral tem sido progressivamente desenvolvido, visando a melhor compreensão de sua biologia e a busca de possíveis novos alvos terapêuticos, vários estudos têm incluído o comportamento do microambiente em linfomas (DE LA CRUZ-MERINO et al. 2012). Neste particular, o estudo do microambiente nos LH é desafiador, já que na maioria dos casos a reação estromal ocupa espaço muito maior que as próprias células tumorais nos tecidos comprometidos (LIU et al. 2014).

No estudo do microambiente dos LHc, algumas controvérsias têm surgido entre as diversas publicações, o que nos levou a propor o presente trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DO LINFOMA DE HODGKIN

O linfoma de Hodgkin recebeu esse nome por ter sido descrito pela primeira vez por Thomas Hodgkin. Este autor fez um relato sobre sete pacientes que tinham linfonodos aumentados, mas indolores, o qual foi intitulado "Sobre algumas aparências mórbidas das glândulas absorventes e baço", que foi apresentado à Sociedade Médica e Cirúrgica em Londres em 1832 e, em seguida, publicado no jornal da sociedade, *Medical-Chirurgical Society Transactions* (HODGKIN 1832). Entretanto, Hodgkin notou que a descrição mais antiga da doença poderia ter sido dada por Marcello Malpighi em 1666, que publicou observações de nódulos esplênicos em uma autópsia de uma jovem de 18 anos (BANERJEE 2012).

Em 1856, Samuel Wilks relatou mais um conjunto de pacientes com a mesma doença descrita por Hodgkin e em 1865 publicou um artigo intitulado "Casos de doença lardácea e algumas afecções assemelhadas, com comentários". Nesse documento, Wilks referiu-se à condição como "Doença de Hodgkin", em homenagem à contribuição anterior de Hodgkin para o assunto (LAKHTAKIA e BURNEY 2015).

O primeiro relato histopatológico do LH foi publicado por Theodor Langhans, em 1872, e a descrição detalhada das células multinucleadas características desta doença foi apresentada por Carl Sternberg, em 1898 e

Dorothy Reed, em 1902. Gall e Mallory estabeleceram o LH como um processo neoplásico em 1942 e a primeira evidência definitiva de sua natureza neoplásica ocorreu em 1967, por meio de uma publicação científica de Seif e Spriggs, que abordava seu cenário citogenético, corroborada posteriormente por Boecker, que em 1975, demonstrou o crescimento clonal das células de Hodgkin (BANERJEE 2012).

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

2.2 EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN

O LH representou 0,4% dos novos casos de câncer no mundo em 2018, sendo responsável por 0,3% das mortes (BRAY et al. 2018).

Para o Brasil, estimam-se 1.480 casos novos de LH em homens e 1.050 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 1,43 casos novos a cada 100 mil homens e a 14^a neoplasia mais frequente. Entre as mulheres, há um risco estimado de 0,96 para cada 100 mil e ocupa a 17^a posição (Ministério da Saúde 2018).

A incidência do LH mostra acentuada heterogeneidade com relação a idade, sexo, raça, área geográfica, classe social e subtipo histológico (GLASER e JARRET 1996). Os asiáticos têm menor incidência que outras raças (GLASER e HSU 2002). A incidência anual do LH parece estável nas últimas décadas. A taxa anual de incidência ajustada por idade é de 2,4 e 2,8 por 100.000 no Reino Unido e EUA, respectivamente (MOZAHEB 2013). Cada vez mais existe grande diferença na incidência entre os países ocidentais desenvolvidos e em desenvolvimento; a doença aparece predominantemente durante a infância e sua incidência diminui com a idade nos países em desenvolvimento (THOMAS et al. 2002). As maiores taxas de incidência do LH são encontradas em indivíduos brancos em São Francisco, Connecticut e na Itália. As taxas são particularmente baixas na Índia, Japão, China (SWERDLOW 2003).

Nos países desenvolvidos, as crianças raramente são afetadas pelo LH, em contraste com adultos jovens onde a incidência aumenta com a idade (THOMAS et al. 2002). Há uma distribuição etária bimodal em ambos os sexos, com um pico em adultos jovens (com idade entre 15-34 anos) e maiores de 60 anos (NAKATSUKA e AOZASA 2006). O subtipo mais comum entre os adultos jovens é esclerose nodular (LHEN). A frequência do subtipo celularidade mista (LHCM) aumenta com a idade, enquanto que o LHEN atinge platô no grupo de maiores de 30 anos (THOMAS et al. 2002).

Os homens são afetados pelo LH um pouco mais do que as mulheres entre todos subtipos (THOMAS et al. 2002), exceto para o LHEN em adultos

jovens, no qual homens e mulheres são igualmente afetados (NAKATSUKA e AOZASA 2006).

Tanto negros quanto asiáticos tiveram taxas de incidência menores que os brancos, o que pode sugerir resistência possivelmente relacionada ao tipo de HLA. O LH é relativamente raro no Japão (incidência ajustada por idade de 0,3 por 100.000 homens) e China (incidência ajustada por idade de 0,2 por 100.000 homens) em comparação com a América do Norte e a Europa. Dentro da União Europeia as taxas mais elevadas são na Áustria e na Grécia e as taxas mais baixas ocorrem na Espanha e Eslováquia, (GLASER e HSU 2002; SHENOY et al. 2011). Dados epidemiológicos apontam para um agente infeccioso como uma causa potencial do LH. Há uma associação entre famílias pequenas, residências unifamiliares, elevado nível educacional materno e ocorrência de LH em pacientes mais jovens em países desenvolvidos (THOMAS et al. 2002).

O reconhecimento de uma associação de LH com infecção por mononucleose infecciosa antecede a descoberta do EBV. Vários estudos acompanhando indivíduos que tiveram mononucleose infecciosa mostraram um risco elevado de LH, geralmente com um risco relativo de cerca de 3 (SWERDLOW 2003). Um estudo mostrou que pessoas com evidência sorológica de infecção por EBV tinha 2,5 a 4 vezes o risco de desenvolver LH que pessoas sem infecção por EBV (MUELLER et al. 1989).

Embora em até 50% dos casos de LH tenha sido identificado infecção por EBV, diagnosticada por estudos moleculares utilizando hibridização *in situ* EBER ou imuno-histoquímica de proteína de membrana de latência-1 (LMP-

1), as características epidemiológicas destes casos não foram examinadas em detalhe. Assim, em 1997, foi publicado um estudo que avaliou dados de 1546 pacientes, provenientes de 12 grupos de pesquisa diferentes, correlacionando idade ao diagnóstico, sexo, etnia, subtipo histológico, país de residência, estágio clínico e presença ou não de positividade para EBV. A positividade para EBV foi avaliada usando regressão logística. Os resultados mostraram que de um total de 618 pacientes portadores de LH, 40% apresentava positividade para EBV. Entretanto, a proporção de casos de LH positivo para EBV variou de acordo com idade, sexo, etnia, subtipo histológico, país de residência e status sócio econômico. Em resumo, homens são a maioria dos casos positivos para EBV; asiáticos, hispânicos, indianos e outras etnias foram o maior número (60-65%), seguido de brancos (35,9%) e negros (16,2%). O subtipo histológico mais comum foi LHCM com 70% dos casos. Pacientes de países menos desenvolvidos apresentavam quase o dobro de positividade para EBV em relação aos países desenvolvidos. As descobertas sugerem que idade, sexo, etnia e status sociais podem representar modificadores biológicos da associação com EBV e confirmam que esta associação é ligada ao subtipo histológico (GLASER et al. 1997).

Muitos casos de LH foram observados em pessoas com a infecção pelo HIV, especialmente aqueles com AIDS, nas quais foi encontrado um risco relativo de cerca de 10 vezes (FRISCH et al. 2001). O risco é provavelmente relacionado à imunossupressão (FRISCH et al. 2001; CLARKE e GLASER 2001). O LH no contexto do HIV tem características distintas: normalmente está associado a infecção por EBV; tende a apresentar-se em estágio

avançado, com sintomas B e envolvimento extranodal. Os subtipos mais comuns são LHCM e LHDL (CLARKE e GLASER 2001).

Em um registro de 500 tumores em pessoas com imunodeficiência congênita, 9% eram LH. Há um risco relativo significativo para LH em pacientes submetidos a transplante alogênico de medula óssea (MOZAHEB 2013).

Familiares de pacientes portadores de LH têm um risco global 3,3 vezes maior de desenvolver LH que a população geral. O risco é significativamente maior entre irmãos que entre pais e filhos. O risco é mais elevado para pessoas que tem muitos familiares com LH (2,8% a 8,4%) e irmãos gêmeos (13%). O risco de desenvolver LH foi maior quando parentes de primeiro grau foram diagnosticados antes dos 30 anos (KHARAZMI et al. 2015).

A susceptibilidade hereditária ao LH permanece inexplicada. Embora muitos estudos de mutações somáticas em células HRS demonstrem associações com tipos de HLA, não foram identificados genes específicos que causam suscetibilidade. Por outro lado, não se sabe se ou como fatores de risco extrínsecos interagem com a suscetibilidade genética (GOLDIN et al. 2005). Os estudos sugerem que no LH o sistema HLA pode influenciar a resistência/suscetibilidade e talvez seja prognóstico (OZA et al. 1994).

Nenhuma associação consistente foi estabelecida na literatura entre o risco de LH e quaisquer exposições ocupacionais, exposição a produtos químicos, tabagismo, estilo de vida ou radiação ionizante (NAKATSUKA e AOZASA 2006).

Fatores hormonais podem ter um papel na etiologia desta doença, como evidenciado pela predominância do sexo masculino em pacientes com mais de 30 anos e o maior risco em mulheres com menos de 45 anos no momento do diagnóstico (CARTWRIGHT e WATKINS 2004).

Muitos estudos têm mostrado variações sazonais na incidência do LH, bem como na taxa de mortalidade após diagnóstico LH, porém com resultados conflitantes. Em 2015, foi publicado um estudo amplo, que demonstrou um pico de incidência em março (15,4%); demonstrou ainda que o risco de morte é maior em pacientes diagnosticados no inverno. Esses dados são para o hemisfério norte e em latitudes altas. Os padrões de sazonalidade encontrados sugerem ação da vitamina D, que teria um papel protetor no LH (BORCHMANN et al. 2017).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DO LINFOMA DE HODGKIN

Os linfomas de Hodgkin são compostos de duas entidades distintas: linfoma de Hodgkin clássico (LHc) e linfoma de Hodgkin tipo predominância linfocitária nodular (LHPLN). Estas duas entidades compartilham várias características importantes que as distinguem dos chamados linfoma não-Hodgkin (LNH): a maioria ocorre em adultos jovens; a apresentação da doença é nodal, principalmente nos linfonodos cervicais. Do ponto de vista da histologia, tem a característica peculiar de conterem poucas células tumorais em meio a fundo rico em linfócitos, eosinófilos e macrófagos.

Essas duas entidades diferem nos seus aspectos clínicos e comportamento biológico, bem como na composição das células do entorno e, principalmente, na morfologia e imunofenótipo da célula tumoral (JAFFE et al. 2008). A incidência entre os dois tipos também difere bastante, já que 95% dos casos de LH correspondem ao tipo clássico e 5% ao tipo predominância linfocitária nodular. A célula padrão no LHc é chamada célula de Reed-Sternberg e Hodgkin (HRS), enquanto o LHPLN se caracteriza pela célula LH (do tipo linfocítico-histiocítico), também conhecida como célula “pop corn” ou também “PL” (KÜPPERS 2009; 2012). Por sua vez, o LHc é subdividido em quatro tipos: esclerose nodular, celularidade mista, depleção linfocitária e rico em linfócitos. Esses subtipos mostram variação na apresentação clínica, imunohistoquímica e na evolução (SHANBHAG e AMBINDER 2018).

O presente trabalho foi realizado apenas com os pacientes portadores de LHc.

2.4 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

- Esclerose nodular

Esse subtipo histológico é definido por bandas de colágeno que circundam pelo menos um nódulo e células de RS e de Hodgkin, algumas com morfologia lacunar. Representa cerca de 70% dos casos de LHc, sendo mais comum em regiões com *status* socioeconômico mais favorecido. A incidência é similar em relação ao sexo e o pico de idade entre 15 a 34 anos.

Envolvimento mediastinal ocorre em cerca de 80% dos casos, ósseo em 5%, pulmonar e/ou esplênico em 8 a 10%, hepático em 2% e de medula óssea em 3%. A maioria dos pacientes apresenta-se em estágio II de Ann Arbor. É o subtipo de melhor prognóstico dentre os LHc. Massa mediastinal é um fator de prognóstico adverso (SHIMABUKURO-VORNHAGEN et al. 2005; MORTON et al. 2006; SWERDLOW et al. 2008).

- Celularidade mista

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

- Rico em linfócitos

Caracteriza-se histologicamente por células de Hodgkin e de RS dispersas em um fundo nodular ou menos frequente, celular difuso, de

pequenos linfócitos e com ausência de eosinófilos e neutrófilos. Este subtipo pode ser confundido com o LHPLN. Compreende cerca de 5% dos casos de LHc. Predomina no sexo masculino e a idade ao diagnóstico é maior em relação aos outros subtipos. Acomete linfonodos periféricos e o envolvimento mediastinal é incomum. A presença de sintomas B é rara e a maioria dos pacientes apresenta-se em estágio I ou II. A sobrevida livre de progressão é ligeiramente melhor em relação aos outros subtipos (DIEHL et al. 1999; SHIMABUKURO-VORNHAGEN et al. 2005; SWERDLOW et al. 2008).

- Depleção linfocitária

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

2.5 IMUNOFENÓTIPO DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

As células HRS do LHc expressam CD30 em quase todos os casos; a expressão de CD15 ocorre em 75% a 85% dos casos; em geral não

expressam CD45. A marcação do CD30 e CD15 é típica, exibindo um padrão de membrana com acentuação do complexo de Golgi do citoplasma; o CD15 pode ser expresso por poucas células neoplásicas e pode ser restrito à região do complexo de Golgi. Em 30% a 40% dos casos, pode haver expressão de CD20, mas em geral em poucas células e com intensidade variável; ainda menos frequente é a expressão do antígeno CD79a (JAFFE et al. 2016; STEIN et al. 2017).

A origem B das células HRS é evidenciada pela expressão de PAX 5 (BSAP), em aproximadamente 95% dos casos de LHc. A marcação de células HRS para PAX5 é geralmente mais fraca que a dos linfócitos B reativos, o que facilita a identificação das células HRS positivas para PAX5. As células HRS costumam expressar o fator de transcrição IRF4 / MUM1, geralmente em alta intensidade. A maioria das células HRS expressam o antígeno associado a proliferação nuclear Ki 67 (JAFFE et al. 2016; STEIN et al. 2017).

Em geral, as células HRS não costumam expressar EMA, CD 138 e os fatores de transcrição Oct2, BOB 1 e PU 1. Embora raramente, pode haver expressão de CD 3, CD 4, CD 45Ro e CD 43. O antígeno LMP1 do EBV pode ser expresso pelas células tumorais, a depender do subtipo do LHc (JAFFE et al. 2016; STEIN et al. 2017).

2.6 ESTADIAMENTO DO LINFOMA DE HODGKIN

O sistema padrão de estadiamento usado para o LH foi proposto em uma conferência em Ann Arbor (estado de Michigan, nos Estados Unidos da

América), no ano de 1971, e modificada no encontro de Cotswolds (Inglaterra), em 1988. Este sistema foi formulado para permitir uma decisão terapêutica segundo a extensão da doença na sua apresentação inicial, baseando-se no número de sítios de envolvimento acima e/ou abaixo do diafragma. Então, resultaram quatro estádios distintos (CARBONE et al. 1971; LISTER et al. 1989).

A modificação ao estadiamento sugerida em Cotswolds incorporou dados de tomografia computadorizada (TC) na avaliação e introduziu a categoria “X” para doença *Bulky* e a “Cru” (do inglês, *complete remission unconfirmed*) para a massa residual pós-tratamento sugestiva de fibrose (LISTER et al. 1989).

- Estadiamento de Ann Arbor modificada em Cotswolds:

I - Região linfonodal única (I) ou um sítio extralinfonodal único (IE).

II - Duas ou mais regiões linfonodais no mesmo lado do diafragma (II) ou extensão local extralinfonodal mais uma ou mais regiões linfonodais do mesmo lado do diafragma (IIE).

III - Regiões linfonodais em ambos os lados do diafragma (III), que pode ser acompanhado por extensão local extralinfática (IIIE). Neste estágio são incluídos casos que, mesmo apresentando acometimento em regiões de apenas um lado do diafragma, acometem também o baço (IIIS, do inglês *spleen*).

IV - Envolvimento difuso de um ou mais órgãos extralinfáticos.

- Sufixos

A - Ausência de sintomas B.

B - Presença de pelo menos um dos seguintes sinais: perda de peso inexplicada maior que 10% durante os 6 meses anteriores ao estadiamento; febre inexplicada recorrente maior que 38°C; suores noturnos recorrentes.

X - Tumor *Bulky*, definido como massa única igual ou maior que 10 cm no maior diâmetro ou massa mediastinal acima de 1/3 do diâmetro máximo transversal transtorácico medido em radiografia de tórax em incidência pósterio-anterior.

Atualmente, utilizam-se os critérios de Cheson (CHESON et al. 1999, 2007), para avaliar a resposta ao tratamento. Os critérios são resumidos na tabela abaixo.

Tabela 1 - Resumo dos critérios de CHESON para avaliação da resposta ao tratamento em linfoma.

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

Fonte: Adaptado de CHESON et al. (2007).

Legenda: RC – Remissão Completa; DE – Doença Estável; PET – Tomografia por Emissão de Pósitrons; (-) – Negativo; MO – Medula Óssea; LN – Linfonodo; DP – Doença em Progressão; (+) – Positivo; RP – Remissão Parcial; TC – Tomografia Computadorizada; IHQ – Imuno-histoquímica

Reconhecendo o progresso científico, em especial das técnicas de imagem, um *workshop* foi realizado na 11^a Conferência Internacional sobre Linfomas Malignos em Lugano, Suíça, em junho de 2011, que contou com a participação de hematologistas, oncologistas, radioterapeutas, patologistas e

radiologistas, representando os principais grupos de ensaios clínicos em linfomas e centros de câncer na América do Norte, Europa, Japão e Austrália. O objetivo era desenvolver melhores critérios de estadiamento e resposta para LH e LNH. As subcomissões enfocaram questões clínicas e de imagem. Em 2013, houve uma oficina de trabalho na 12ª Conferência Internacional sobre Linfomas Malignos, que definiu novas recomendações para avaliação inicial, estadiamento e critérios de resposta para os linfomas (CHESON et al. 2014).

- Resumindo as novas recomendações:
- A biópsia excisional é preferível para o diagnóstico, embora nos casos em que não seja possível, pode ser realizado a biópsia com agulha grossa.
- A avaliação clínica inclui história cuidadosa, testes laboratoriais relevantes e registro de sintomas relacionados à doença.
- O PET-CT (tomografia computadorizada com emissão de pósitrons) é o exame padrão para linfomas ávidos por FDG (fluorodeoxiglicose), sendo formalmente incorporado ao estadiamento do LH.
- É recomendada a utilização do estadiamento de Ann Arbor modificado em Cotswolds, o qual compõe, junto com outros parâmetros, o índice de prognóstico dos LH, fornecendo parâmetros para o tratamento e avaliação de risco.
- Os sufixos A e B são necessários apenas para LH. A designação X para doença volumosa (doença *Bulky*) já não é necessária; em vez disso, é necessário referir o maior diâmetro do tumor.

- Se um PET-CT é realizado, não está mais indicada a biópsia de medula óssea para LH.

2.7 PATOLOGIA E BIOLOGIA DO LINFOMA DE HODGKIN

2.7.1 Origem das células neoplásicas de Hodgkin-Reed-Sternberg

No LHc, as células tumorais características são designadas no seu conjunto por células de HRS. A origem das células tumorais do LH permaneceu desconhecida durante vários anos, em parte devido ao seu imunofenótipo pouco característico, mas também porque o pequeno número de células tumorais em meio ao abundante infiltrado inflamatório dificultou a utilização de técnicas de biologia molecular para detectar rearranjos dos genes da imunoglobulina (IG) ou do receptor das células T (TCR, do inglês *T-cell receptor*). A confirmação de que estas células resultam da proliferação clonal de células B foi conseguida com a associação da microdissecção de células tumorais isoladas à análise dos genes da IG, tendo-se demonstrado que as células de HRS apresentavam rearranjo clonal desses genes (SCHMITZ et al. 2009).

As células de HRS apresentam, então, rearranjos dos genes das cadeias pesadas e/ou leves das IGs, que são idênticos entre as células de um mesmo paciente. Isto comprova sua origem nas células B e sua natureza clonal. Por outro lado, a ocorrência de hipermutações somáticas na região variável do gene da IG (IgV) apoia a origem das células HRS em células linfoides B que encontram-se ou passaram pelos centros germinativos

(FARRELL e JARRETT 2011). A origem das células de HRS a partir de células B instruídas nos centros germinativos foi também verificada na análise de linfomas compostos, ou seja, em casos nos quais o paciente é portador de um LHc e um LNH concomitantemente ou em sucessão. Estes linfomas possuem rearranjos genéticos idênticos do IgV, mas mutações somáticas distintas, o que sugere um precursor comum, isto é, uma célula B dos centros germinativos (KÜPPERS et al. 2001).

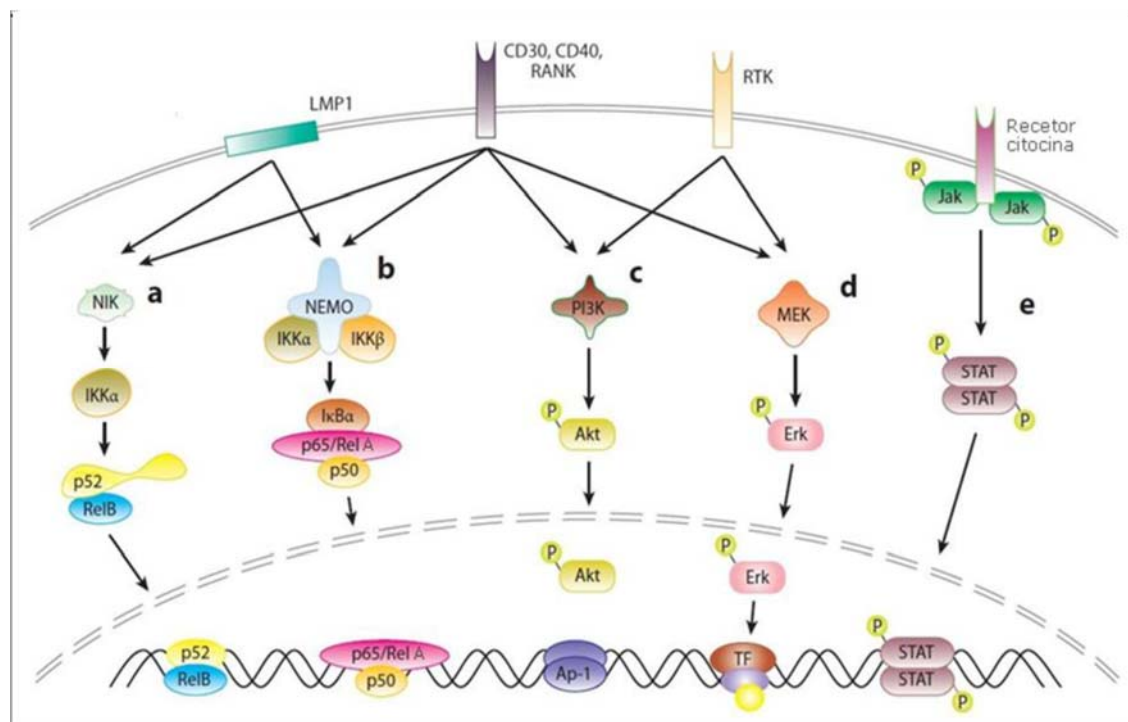
2.7.2 Desregulação dos fatores de transcrição e sinalização

Apesar da sua origem, as células de HRS apresentam perdas na expressão de genes específicos das células B. As células HRS não produzem Igs nem possuem um receptor de células B funcional (BCR, do inglês *B-cell receptor*) (FARRELL e JARRETT 2011). Em cerca de um quarto dos casos, as mutações somáticas tornam o rearranjo genético de IgV não funcionante, pela introdução de mutações ou deleções. Por outro lado, verifica-se um comprometimento severo da atividade dos fatores de transcrição que habitualmente regulam a expressão génica das células B, como o PU.1, o OCT-2 (*octamer-binding transcription factor-2*) e o BOB.1 (*B-cell specific octamerbinding protein 1*). Esses fatores, presentes em linfócitos B normais e neoplásicos (nos LNH), usualmente não são detectados nas células de HRS, contribuindo para a diminuição da transcrição dos genes das Igs (SCHWERING et al. 2003). Esta também pode ser reforçada por modificações epigenéticas que condicionam o silenciamento dos genes através, por exemplo, da metilação do ácido desoxirribonucleico em sequências ricas em

dinucleótidos CpG (citosina, guanina) (BRÄUNINGER et al. 2006). Outros importantes fatores de transcrição específicos das células B estão presentes nas células de HRS, mas são disfuncionais, como o E2A, o EBF (*early B-cell factor*) e o PAX5 (*paired-box transcription factor 5*), que controlam a expressão de vários genes durante o desenvolvimento inicial das células B, como o CD19 (*cluster differentiation 19*) e o CD79a, assegurando também a expressão gênica adequada nas células B maduras. O NOTCH1 é largamente expresso nas células de HRS, sendo ativado pela interação com o seu ligante, o JAGGED1, que é produzido pelas células não-neoplásicas circundantes. Trata-se de um fator de transcrição das células T, que promove o desenvolvimento das mesmas e suprime a diferenciação das células B, através da degradação do E2A e do bloqueio da ligação do EBF ao ácido desoxirribonucleico. O E2A é também inativado pela expressão do ID2 (*inhibitor of differentiation and DNA binding 2*) e do ABF1 (*activated B-cell factor 1*) nas células de HRS. Além disto, a ativação do NOTCH1 inibe ainda o PAX5, tanto durante a transcrição como após a tradução (FARRELL e JARRETT 2011).

Normalmente, as células B dos centros germinativos com um BCR não funcional sofrem apoptose. A sobrevivência e proliferação das células de HRS, apesar dos estímulos apoptóticos, é considerada o evento central da oncogênese do LHc. Para tal, parecem contribuir a desregulação de várias vias de sinalização celular, cujas causas são apenas parcialmente compreendidas, mas que incluem mecanismos de *feedback* parácrinos e

autócrinos, além de lesões genéticas detectadas nas células de HRS (SCHMITZ et al. 2009). A Figura 1 ilustra essas vias.



Fonte: Adaptado de SCHMITZ et al. (2009)

Legenda: (a) (b) A estimulação dos receptores CD30, CD40 e RANK (*receptor activator of NF-κB*), assim como da LMP-1, desencadeiam uma série de eventos, de que resulta a translocação nuclear da família proteica do NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) e consequente ativação dos genes alvo, NIK (*NF-κB inducing kinase*) e NEMO (*NF-κB essential modulator*). (c) A AKT (*protein kinase B*) e a (d) ERK (*extracelular signal-regulated kinase*) ativadas podem fosforilar múltiplos substratos no citoplasma e no núcleo. (e) A estimulação dos receptores das citocinas resulta na ativação da via JAK-STAT (*janus kinase–signal transducers and activators of transcription*).

Figura 1 - Principais vias de sinalização das células de HRS.

O NF-κB (do inglês *nuclear factor-kappa B*) é uma família de fatores de transcrição que se encontra envolvida em vários processos celulares, notadamente na resposta inflamatória, adesão celular e na sobrevivência celular. Essa família inclui cinco proteínas que atuam como homo e

heterodímeros: RELA (p65), RELB, c-REL, NF- κ B1 (p50 e o seu precursor p105) e NF- κ B2 (p52 e o seu precursor p100). O NF- κ B é mantido inativo no citoplasma, pela ligação das proteínas inibitórias I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ e proteínas precursoras p105 e p100. A estimulação dos receptores celulares da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*), leva à ativação da quinase da I κ B (IKK), com fosforilação destas proteínas e sua consequente degradação proteolítica no proteasoma. Desta forma, o NF- κ B fica livre, passando para o núcleo, onde estimula a transcrição de vários genes, particularmente os que codificam citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-13, TNF- α e CCL5) e fatores antiapoptóticos (BCL-XL), cIAP2 e FLIP (JOST e RULAND 2007).

Habitualmente, a ativação da via de sinalização do NF- κ B é transitória e rigorosamente controlada, no entanto, nas células de HRS encontra-se permanentemente ativa por diferentes mecanismos: (a) aumento da expressão de vários receptores do TNF pelas células de HRS, como o CD30, CD40, RANK e CD95; (b) estimulação parácrina destes receptores, devido à produção de ligantes pelo componente celular do microambiente que circunda as células de HRS; (c) presença do EBV, que contribui diretamente para a ativação da via através da LMP-1 do EBV; (d) mutações deletérias dos genes que codificam as proteínas inibitórias I κ B e a proteína A20, envolvida na regulação do NF- κ B e (e) amplificação da região cromossômica que inclui o gene *c-REL* (ADAMS et al. 2011).

A ativação da via de sinalização JAK-STAT também tem sido implicada na sobrevivência e proliferação das células de HRS, contrapondo-se aos

estímulos apoptóticos. Esta via representa um dos mecanismos centrais de sinalização por citocinas, como a IL-5, IL-6, IL-9, IL-13 e o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-monocyte colony stimulating factor*). No LH, as citocinas capazes de ativar esta via são produzidas em abundância, o que resulta em níveis elevados de STAT3, STAT5 e STAT6 fosforiladas nos núcleos das células de HRS. Por outro lado, existem também alterações genéticas capazes de afetar o funcionamento normal dessa via, como a amplificação do gene *JAK2* e as mutações do *SOCS-1* (do inglês *suppressors of cytokine signaling-1*), que regula negativamente o gene *JAK* (FARRELL e JARRETT 2011).

Concluindo, há desregulação de múltiplas vias de transcrição e sinalização celular no LH que cooperam entre si para aumentar a proliferação celular, reduzir a apoptose e promover um ambiente celular favorável, através da libertação de múltiplas citocinas e quimiocinas.

2.7.3 Lesões genéticas

A identificação de alterações genéticas nas células HRS é dificultada pelo pequeno número destas células nos tecidos. No entanto, a utilização das técnicas de hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do inglês *fluorescent in situ hybridization*) e a microdissecção de células isoladas para realizar técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, a PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) permitiram o reconhecimento de lesões genéticas importantes na patogênese do LH. Com esta tecnologia, reconheceu-se a alta instabilidade genômica das células de HRS, tipicamente com múltiplas alterações, tanto

numéricas, quanto estruturais, das quais algumas são clonais, enquanto a maioria ocorre apenas em subclones. Contudo, a causa subjacente a esta instabilidade genômica não se encontra ainda esclarecida (SCHMITZ et al. 2009).

A análise genética das células tumorais do LH permitiu a identificação de outros oncogenes e de vários genes supressores tumorais que podem estar envolvidos na sua patogênese. É o caso do anteriormente referido gene *c-REL* no cromossomo 2p16, que codifica um componente do NF- κ B e que sofre amplificação em cerca de 50% dos casos de LHc, resultando em aumento dos níveis nucleares de c-REL, contribuindo então para a ativação contínua do NF- κ B. Em cerca de 10-20% dos casos de LHc encontram-se ainda mutações inativadoras dos genes de duas proteínas inibitórias do NF- κ B, a I κ B α e I κ B ϵ , sobretudo do gene que codifica a I κ B α . Estes genes parecem funcionar como supressores tumorais. Também se verificam alterações do gene que codifica a proteína A20, que, assim como as proteínas anteriores, inibe a ativação do NF- κ B. Foram identificadas deleções recorrentes da região cromossômica do gene *A20* 6q23 em linhagens de células de HRS, bem como mutações inativadoras em cerca de 45% dos casos de LHc. Curiosamente, apenas o LHc não associado ao EBV apresentava tais mutações, motivo pelo qual o gene *A20* pode funcionar como supressor tumoral nestes casos (SCHMITZ et al. 2009). A via de sinalização JAK-STAT é igualmente ativada por outras alterações genéticas das células tumorais. Em cerca de 25% dos casos de LHc, o locus *JAK2* no cromossoma 9p24 encontra-se amplificado e verificam-se mutações inativadoras do gene

SOCS-1 nas células de HRS e LP, que habitualmente inibe a ativação desta via de sinalização celular (SCHMITZ et al. 2009).

Além do referido acima, as células tumorais expressam o receptor FAS, um fator pró-apoptótico, apesar de serem resistentes à apoptose por esta via. Por outro lado, são raras as mutações encontradas a este nível e nenhuma ocorre nos genes do complexo que sinaliza a morte celular, FADD, caspase 8 e caspase 10. No entanto, portadores de mutações germinativas do gene *FAS* apresentam um risco 50 vezes maior de desenvolver LH (STRAUS et al. 2001). Há evidências de que a resistência à apoptose mediada pela via FAS se deva ao aumento da expressão do FLIP, um inibidor desta via cuja atividade está aumentada pelo NF- κ B (MAGGIO et al. 2003). As células de HRS também expressam elevados níveis de p53, associados a mutações que provocam a perda da sua função supressora tumoral (FEUERBORN et al. 2006). Tal função pode ser inibida pela ligação da proteína MDM2 (do inglês *murine double minute 2*), que se encontra aumentada nas células tumorais. Foram analisados outros oncogenes e genes supressores tumorais, tais como o *ATM*, *BAD*, *BCL-10* e *RAS*, mas as lesões genéticas identificadas são raras (KÜPPERS 2012).

2.7.4 Papel do EBV na patogênese do Linfoma de Hodgkin

O EBV representa um herpes vírus que infecta cerca de 90% dos seres humanos. Em crianças, a maioria das infecções pelo EBV são assintomáticas ou causam sintomas inespecíficos. Quando a infecção primária é adiada até a adolescência pode resultar na síndrome da mononucleose infecciosa (MI)

em 50% dos pacientes. Demonstrou-se que o risco relativo de desenvolver LHc em indivíduos com uma história de MI, em relação àqueles sem antecedentes dessa síndrome varia entre 2,0 e 5,0 vezes (COHEN 2000).

O encontro de altos títulos de anticorpo contra o EBV foi a primeira evidência do envolvimento desse vírus na patogênese do LHc. Com o advento das sondas para detecção do vírus pela técnica de hibridização de Southern Blot mostrou-se que o DNA do EBV estava presente em 20 a 25% dos LHc. Posteriormente, a demonstração do RNA codificado pelo EBV (EBER1 e EBER2, do inglês *Epstein-Barr early RNA*) em células HRS proporcionou um método sensível para detecção da infecção latente. Nos LH associados ao EBV, o genoma viral é encontrado na forma monoclonal, indicando que a infecção das células tumorais ocorreu antes da sua expansão clonal. Na maioria dos casos, o EBV é encontrado durante todo o curso do LH e em múltiplos locais da doença.

A taxa de detecção de EBV em LHc depende de fatores tais como o país de residência, tipo histológico, sexo, etnia e idade. A positividade para EBV em LHc é menos comum em populações de países desenvolvidos, com percentagens de 20-50% para a América do Norte e Europa, 57% nos casos da China, mas com taxas elevadas em países não desenvolvidos. O aumento da incidência da positividade para EBV em LHc em países subdesenvolvidos poderia ser devido à existência de uma imunossupressão subjacente semelhante ao observado para o linfoma de Burkitt africano. Alternativamente, o momento da infecção pelo EBV (que é provável que ocorra mais cedo nos

países em desenvolvimento) também pode ser importante (KAPATAI e MURRAY 2007).

No Brasil, estudos clínico-epidemiológicos realizados por grupos diferentes, com populações diferentes, tanto do ponto de vista geográfico quanto socioeconômico, demonstram que a expressão de EBV no LH varia de 55% a 64% dos casos (ELGUI DE OLIVEIRA et al. 2002). Contudo, um estudo publicado recentemente avaliando os pacientes portadores de LHc acompanhados em hospitais do estado de São Paulo mostrou que entre crianças, adolescentes e adultos jovens, houve uma queda substancial no número de casos de LHc associado a infecção pelo EBV. Nos pacientes maiores de 45 anos, a queda não foi significativa (CAMPOS et al. 2018).

O EBV é mais comumente associado com o subtipo CM em relação aos outros subtipos. A presença de positividade para EBV em LHc nos grupos etários mais velhos e as crianças, especialmente os meninos menores de 10 anos, ocorre mais que em adultos jovens, levando à sugestão que o LHc é composto por três entidades segundo a associação com o EBV: O LH da infância (positivo para EBV, subtipo CM); o LH de adultos jovens (negativo para EBV, subtipo EN) e LH de adultos mais velhos (positivo para EBV, subtipo CM) (ARMSTRONG et al. 1998; VASSALLO et al. 2001). Em células HRS EBV+ são expressas três proteínas virais: EBNA1 (do inglês Epstein-Barr nuclear antigen-1), LMP1 e LMP2A e dois ácidos ribonucleicos não-codificantes (BART e EBERs). O EBNA1 é expresso em todas as células infectadas por EBV em proliferação, uma vez que é importante para a replicação do epissomo viral e sua distribuição para as células filhas. O

EBNA1 também pode contribuir diretamente para a fisiopatologia do LH, uma vez que pode mediar o aumento da regulação de CCL20 para atrair as células Tregs (KÜPPERS 2009; FUKUDA e KAWAGUCHI 2014). No infiltrado inflamatório relacionado ao tumor, as células Tregs tem função de inibir a ação de células T efectoras, principalmente as células T citotóxicas, que normalmente teriam efeito anti-tumoral.

A LMP1 simula um receptor ativo, o CD40, induzindo assim a ativação de NF-kB. Adicionalmente, a LMP1 pode ativar as vias sinalização JAK-STAT, PI3K, p38 e AP1. A LMP2a pode simular a função de um receptor de célula B. Assim, o EBV fornece dois sinais essenciais para a sobrevivência das células B do centro germinativo. O papel específico do EBV na patogênese do LHc é fundamentado pela constatação de que células B de centro germinativo que adquiriram mutações do receptor de células B podem sobreviver, sendo resgatadas da apoptose pela expressão LMP2a e, em casos raros, dando origem a células HRS (POPPEMA 2005; LEVENTAKI et al. 2014).

Um estudo recente mostrou a contribuição de EBV para o recrutamento de Tregs, o tipo de célula predominante na população de células T do LH. Os autores mostraram que a presença de EBV nas células LH esteve associada a aumento da expressão da quimiocina CCL20, e que os altos níveis de CCL20 tem como consequência o aumento da migração de linfócitos T CD4+ que expressam FOXP3, um marcador de células Tregs. Esta superexpressão de CCL20 pode ser estimulada pelo EBNA1, o que pode explicar como a infecção por EBV inibe a resposta viral específica das células T citotóxicas (BAUMFORTH et al. 2008).

Um outro estudo avaliou a presença de macrófagos associados ao tumor (TAM, do inglês *tumor associated macrophages*) no microambiente tumoral através de imunohistoquímica, utilizando anticorpos contra CD68 e CD163, que são antígenos associados à linhagem monocítica/macrofágica. Este estudo demonstrou que expressão elevada de ambos os marcadores foram associados à positividade para o EBV na célula tumoral (positividade para EBER e LMP1), e foi maior nos casos de LHc do subtipo celularidade mista. Neste estudo, numa análise univariada, a alta expressão de CD68 e CD163 foi relacionada a prognóstico adverso. Entretanto, após uma análise multivariada, a influência do CD68 se manteve, enquanto a do CD163, não. Uma possível explicação para esse achado é que o CD68 abrange uma gama mais ampla de células envolvidas na resposta imune e então reflete melhor as células do microambiente que o CD163, que é um marcador linhagem-específico. Foi observado ainda que o impacto adverso de altos níveis de CD68 persistiu mesmo quando os casos com histologia de esclerose nodular foram analisados separadamente, sugerindo que o valor preditivo do CD68 independe do subtipo histológico do LHc (KAMPER et al. 2011).

2.7.5 Interação com o microambiente tumoral

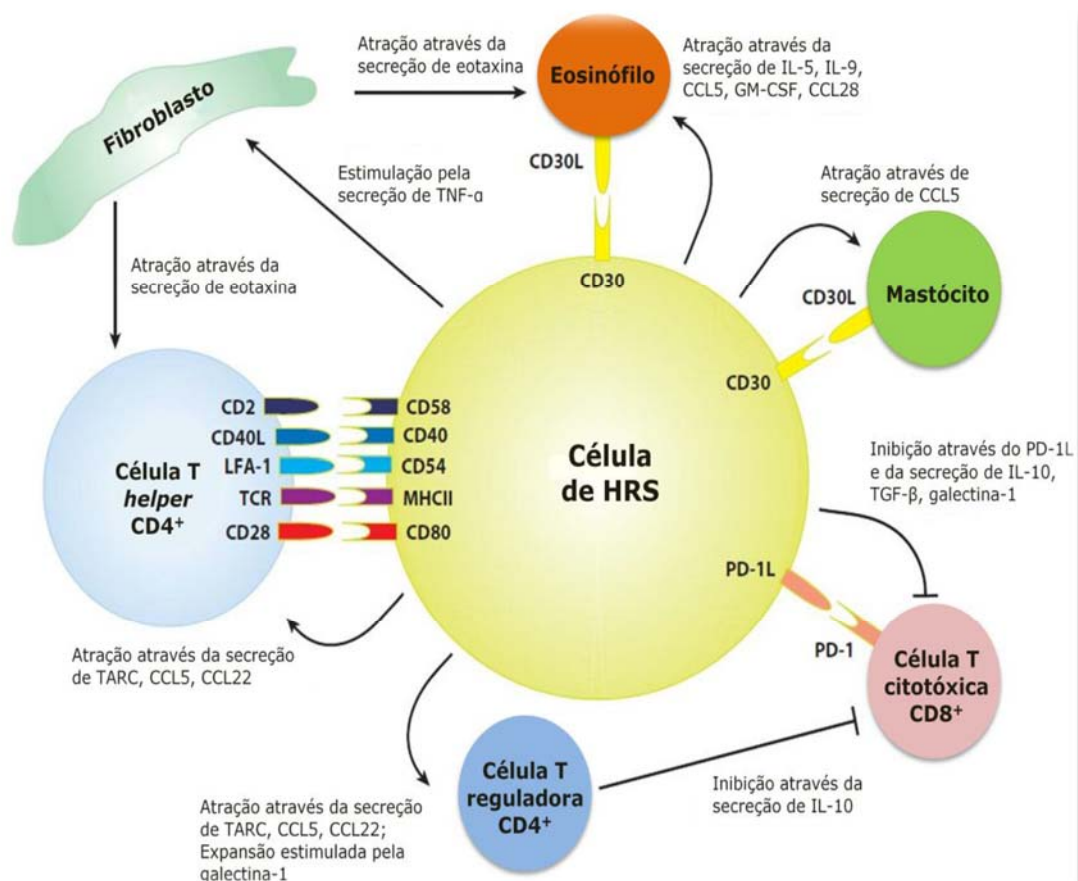
O LH tem a característica única de ser uma neoplasia na qual as células neoplásicas compreendem cerca de 1% das células responsáveis pelo aumento do volume do linfonodo, sendo o restante representado pela infiltração de muitos tipos diferentes de células do sistema imune, incluindo linfócitos T, linfócitos B, plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos. Há

evidências de que o recrutamento de células inflamatórias para o microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin seja essencial para a sobrevivência da célula HRS e que estas necessitam de sinais parácrinos recebidos de outras células para sobreviverem. Células HRS dificilmente crescem em cultura, não sobrevivem em camundongos imunodeficientes, raramente são encontradas no sangue periférico e quando se disseminam para outros órgãos, geralmente reproduzem o microambiente tumoral inicial, rico em células inflamatórias (KAPP et al. 1994).

Há várias linhas de evidências que sugerem que as células HRS recrutam muitas das células que compõem o microambiente através da secreção de quimiocinas e citocinas. Por outro lado, as células HRS se beneficiam de sinais parácrinos induzidos pelas células não tumorais pertencentes ao rico microambiente. As células T CD4⁺ representam a maior população de células infiltrantes nos tecidos envolvidos pelo LHc. Estas células são presumivelmente atraídas pelas quimiocinas CCL5, CCL17 (TARC) e CCL22, secretadas por células HRS e pela CCL11, que é secretada por fibroblastos. Estudos revelam que parte da população de linfócitos T são linfócitos T auxiliar-2 (Th2). Estas células, que são frequentemente localizadas junto às células HRS, expressam CD40L (ligante de CD40) e, portanto, podem estimular a via de sinalização CD40 em células HRS. Os antígenos de histocompatibilidade maior classe II (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) e os fatores estimuladores de células T, CD80 e CD86, são expressos na superfície de células HRS, promovendo interação com os linfócitos T circundantes. Os linfócitos Tregs, que expressam CD4, CD25 e

FOXP3, também são parte importante do microambiente tumoral no LH. Linfócitos Tregs têm um papel essencial na autoimunidade, embora possam ainda suprimir os linfócitos reativos aos antígenos tumorais. Isto ocorre através da inibição de IL2 e CD25 (IL2R α), que adia ou impede a ativação de células T citotóxicas CD8⁺ e de células NK (do inglês *natural killer*). Os linfócitos Treg também secretam IL10, uma citocina supressora. Estes efeitos de Tregs podem proteger as células HRS de linfócitos T citotóxicos e células NK, particularmente nos casos associados ao EBV, nos quais a célula HRS expressa o antígeno viral (KAPP et al. 1994).

O recrutamento de eosinófilos para o microambiente tumoral decorre da secreção de fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos, IL5, IL9, CCL5 e CCL28 por células HRS e CCL11 por fibroblastos. Os eosinófilos contribuem para a patogênese do LHc pela secreção de fator de crescimento transformador Beta (TGFB, do inglês *transforming growth factor-Beta*) e expressão de CD30L (ligante do CD30), o qual estimula a sinalização nas células HRS. A secreção de CCL5 por células HRS atrai eosinófilos, linfócitos T CD4⁺ e mastócitos, os quais também expressam o CD30L. Os mastócitos podem contribuir para o crescimento tumoral por facilitar a angiogênese e remodelação dos tecidos (SCHMITZ et al. 2009). A figura 2 resume a interação da célula HRS com o microambiente do linfoma de Hodgkin.



Fonte: SCHMITZ et al. (2009).

Figura 2 - Interações da célula de HRS do LHC com as células do microambiente. O microambiente celular no LHC é constituído por algumas células de HRS rodeadas por um grande infiltrado de células inflamatórias, que podem constituir 99% de todas as células no tecido tumoral e que consistem sobretudo em fibroblastos, eosinófilos, mastócitos, células B, plasmócitos e células T. As células neste microambiente são atraídas por várias citocinas. Os fibroblastos libertam eotaxina que atrai células T CD4+ e eosinófilos. A via de sinalização do ligando CD30 (CD30L)/CD30 ativada pelos eosinófilos e mastócitos promove a sobrevivência das células de HRS. Estas células também recebem múltiplos estímulos proliferativos das células T CD4+, através das interações CD54-LFA-1, ligando CD40 (CD40L)/CD40, MHCII/TCR, CD58/CD2 e CD80/CD28. A função dos LTC é inibida pela interação ligando PD-1 (PD-1L)/PD-1 entre estas células e as células de HRS e pela secreção de IL-10, TGF- β e galectina-1 pelas células tumorais. São também inibidos pela libertação de IL-10 pelas Tregs.

Macrófagos representam uma população heterogênea de células que são um constituinte principal do microambiente tumoral, onde promovem ou inibem a tumorigênese e metástase, dependendo de seu estado. A princípio, pensava-se que os macrófagos associados ao tumor eram recrutados pelo organismo para agir contra o tumor. Entretanto, evidências crescentes mostram que macrófagos são requisitados pelo tumor, para protegê-lo da ação de outras células do microambiente tumoral. Dados clínicos sugerem que uma alta densidade de TAMs está associado a um mau prognóstico em mais de 80% dos tumores humanos (BINGLE et al 2002). A alta densidade tumoral de TAMs foi significativamente associada ao aumento da densidade vascular, resistência à quimioterapia e pior resultado clínico na maioria dos tumores, incluindo câncer de pulmão, colorretal, mamário, ovário, melanoma maligno, linfoma de Hodgkin e mieloma múltiplo (GUERRIERO 2018).

Há evidência clínica e experimental que macrófagos promovem a iniciação e a progressão do câncer. Durante a iniciação do tumor, macrófagos criam um ambiente inflamatório mutagênico e promotor de crescimento. Com a progressão do tumor, os macrófagos estimulam a angiogênese, intensificam a migração de células tumorais e suprimem a atividade antitumoral. Em sítios metastáticos, macrófagos preparam o tecido-alvo para a chegada das células tumorais. Em seguida, uma subpopulação diferente de macrófagos promove o extravasamento de células do tumor, sobrevivência e crescimento subsequente (CONDEELIS e POLLARD 2006).

Macrófagos são células mononucleares da linhagem fagocítica com uma diversidade de funções que levou a várias tentativas de classificação. As

classificações mais bem-sucedidas foram aplicadas a subpopulações macrofágicas segundo sua participação nas respostas imunológicas. Macrófagos classicamente ativados são células efetoras potentes que matam microorganismos e células tumorais, produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e ativam linfócitos T citotóxicos. Esses macrófagos são os chamados macrófagos "M1". Por outro lado, os macrófagos podem ser ativados de uma maneira que promova a remodelação e o reparo dos tecidos e atraiam preferencialmente subconjuntos de células T desprovidos de funções citotóxicas, como células T reguladoras (Tregs) e células T helper tipo 2 (Th2). Os macrófagos alternativamente ativados são os chamados macrófagos "M2". Ao avaliar a função dos TAMs, eles mostram funções protumorais que promovem a sobrevivência, proliferação, angiogênese, disseminação e quimiorresistência do tumor (GUERRIERO 2018).

No linfoma de Hodgkin, vários estudos demonstram que o aumento do número de macrófagos no microambiente tumoral se correlacionava com parâmetros clínicos e patológicos desfavoráveis da doença (REE e KADIN 1985). Outros pesquisadores usaram o perfil de expressão gênica para identificar uma assinatura do gene TAM significativamente associada à falha do tratamento primário. Eles validaram ainda esses achados usando o anticorpo CD68, mostrando que um número aumentado de TAMs CD68 + nas amostras de biópsia de linfonodos de pacientes com LH estava associado a prognóstico clínico adverso (STEIDL et al. 2010; STEIDL et al. 2011b). A possibilidade de empregar um anticorpo já utilizado na rotina como marcador prognóstico, impulsionou vários estudos. Desde então, outros estudos

demonstraram a importante correlação entre o aumento do número de TAMs de acordo com a expressão de CD68 e um pior curso clínico do LH (TZANKOV et al. 2010; KAMPER et al. 2011; TAN et al. 2012; GREAVES et al. 2013). Por outro lado, também foram publicados estudos que não demonstraram correlação significativa entre TAMs CD68 + e pior prognóstico clínico para LH (HARRIS et al. 2012; SANCHEZ-ESPIRIDION et al. 2012; KAYAL et al. 2014).

Vale ressaltar ainda que o microambiente do linfoma de Hodgkin relacionado ao EBV tem aspectos distintos daquele do linfoma de Hodgkin não relacionado ao EBV. A presença de EBV pode alterar a expressão de citocinas e quimiocinas. De fato, o EBV favorece uma reação Th1 no microambiente do LH. Nos casos de LH com positividade para EBV, há uma maior expressão de IL-12, responsável pela diferenciação de células Th1-, bem como de quimiocinas que suportam uma resposta Th1 (IP-10, Mig, MIP-1). Consequentemente, as células T CD8 + são mais numerosas no infiltrado reativo dos casos de EBV +. No entanto, esta tentativa de resposta imune mediada por células em casos de EBV + parece ser ineficaz, porque há uma supressão local de células T citotóxicas especificamente direcionadas a antígenos de EBV. Essa supressão pode ser devida à presença de IL-10, um citocina anti-inflamatória potente frequentemente produzida por células HRS em casos de LHc com positividade para EBV. LMP1 pode induzir expressão celular de IL-10 em células EBV + (ALDINUCCI et al. 2010; CARBONE e GLOGHINI 2018).

O microambiente tumoral do LHc associado ao EBV também é caracterizado por um número significativamente maior de macrófagos CD68

+, CD163 + do que o de LHc não relacionado a EBV. Dependendo da disponibilidade de diferentes sinais microambientais, os macrófagos podem sofrer ativação polarizada em dois estados funcionais: os macrófagos M1 com um fenótipo pró-inflamatório, com capacidade de promover respostas Th1 e matar células tumorais e os macrófagos M2 com atividade potente de promoção de tumores, funções reguladoras no reparo e remodelação de tecidos e promoção de respostas Th2. Nos LHc com positividade para EBV, a principal polarização dos macrófagos é o fenótipo M1, que está de acordo com um microambiente predominantemente Th1 (CHETAILLE et al. 2009; KAMPER et al. 2012).

Apesar dos dados conflitantes na literatura, duas metanálises recentes mostram que os TAM podem ser preditores de mau prognóstico no linfoma de Hodgkin, tornando-se um potencial alvo terapêutico. Entretanto, não há uniformidade na avaliação dos TAM, requerendo uma validação clínica adicional para confirmar o papel dos TAM como biomarcadores (GUO et al. 2016; JIANG et al. 2016).

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O LH é uma das neoplasias do sistema linfo-hematopoiético com maior taxa de cura. Aproximadamente 80% dos pacientes diagnosticados em estádios iniciais e 65% dos pacientes diagnosticados em estádios avançados alcançam longas remissões com o tratamento de primeira linha com quimioterapia associada ou não a radioterapia. Entretanto, cerca de 10% a 15% dos pacientes em estádios precoces e 20% a 35% daqueles em estádios avançados, progridem após o tratamento de primeira linha, necessitando de tratamento adicional, representado por quimioterapia em alta dose (de resgate ou salvamento), seguida por transplante autólogo de células-tronco, quando não há contraindicação para esse procedimento (SANTOS et al. 2008). Essa segunda linha de tratamento induz remissão em longo prazo para aproximadamente 50% dos pacientes. Pacientes que são refratários ou progridem após o transplante em até um ano tem mau prognóstico com tempo mediano de sobrevida de aproximadamente 1,2 ano (ARAI et al. 2013).

Por outro lado, calcula-se que cerca de 20% dos pacientes são super-tratados. O resultado é aumento nas comorbidades resultantes do tratamento, como desenvolvimento de segunda neoplasia e disfunção de órgãos-alvo (STEIDL et al. 2011a e b).

Para tratar os pacientes que falharam após essas terapêuticas de resgate, novas drogas foram aprovadas, como o brentuximabe vedotina, um conjugado droga-anticorpo com ação anti-CD30. Também estão em uso os

anticorpos monoclonais nivolumabe e pembrolizumabe, com ação anti-PD1, que mostraram altas taxas de resposta e durabilidade do benefício (SANTOS et al. 2008; SHANBHAG e AMBINDER 2018).

Nos últimos anos, há uma melhor compreensão da biologia do LH, dos efeitos colaterais tardios da terapia, favorecendo uma abordagem personalizada adaptada ao risco. Essa abordagem promete fornecer toxicidade mais baixa e taxas de cura mais altas para pacientes de menor risco, reservando regimes mais agressivos para os pacientes de alto risco que realmente precisam deles (SHANBHAG e AMBINDER 2018).

A estratégia central da medicina personalizada é o uso de um biomarcador, definido como uma característica que é objetivamente mensurada e avaliada como indicador de um processo biológico normal, um processo patológico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Muitos biomarcadores também fornecem informações sobre a evolução clínica de uma doença e a capacidade de distinguir pacientes com melhor prognóstico daqueles que terão resultados mais pobres.

Os estudos de microambiente tumoral no LH sugerem uma base para o estudo de biomarcadores que possam melhor selecionar os pacientes e a terapêutica, já que há uma importante interação entre o LH e o seu microambiente. Embora existam estudos promissores com alguns biomarcadores, as diferentes técnicas aplicadas podem ser responsáveis por resultados conflitantes.

Muitas questões ainda não estão respondidas. Embora hoje saibamos que a interação com o microambiente e a capacidade de fazê-lo trabalhar a

favor da progressão da neoplasia seja uma das marcas do câncer, esse conhecimento não está ainda validado para todas as neoplasias, dependendo da sua incidência, prevalência e importância econômica.

Em dois estudos brasileiros que avaliaram o número de macrófagos associados ao tumor através da imunoexpressão de CD68 e CD163 não encontraram nenhuma relação entre o número de macrófagos e a sobrevida livre de doença e a sobrevida global dos pacientes, contrariando alguns estudos da literatura (AZAMBUJA et al. 2012; ASSIS et al. 2012). Assim, nosso projeto objetiva contribuir no estudo do microambiente tumoral no LHc, avaliando a interação entre o linfoma e seu microambiente, em busca de marcadores de prognóstico no infiltrado inflamatório associado ao tumor. No presente trabalho, por se tratar de um estudo em duas instituições localizadas em regiões geográficas distintas do país (Sudeste e Nordeste), será também possível avaliar se há diferenças regionais entre parâmetros clínicos e patológicos, em particular na composição do infiltrado inflamatório associado ao linfoma.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o microambiente tumoral no LHc em duas populações brasileiras, procedentes de diferentes regiões geográficas, São Paulo e Ceará, comparando o perfil do infiltrado inflamatório relacionado ao tumor em cada população, utilizando os marcadores de linfócitos T e suas subpopulações, linfócitos B e macrófagos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar se as características clínico-patológicas diferem nas duas populações, como subtipo histológico, status do EBV, estágio da doença, distribuição por gêneros, idade e sobrevida.
- 2 Avaliar se há diferença entre as subpopulações do microambiente tumoral nessas populações.
- 3 Avaliar se o status do EBV influencia as subpopulações do microambiente tumoral.
- 4 Avaliar se as subpopulações do microambiente têm impacto na sobrevida livre de eventos.

5 METODOLOGIA

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de ambas as instituições envolvidas, do A.C.Camargo Cancer Center, sob número 2084/2015 e do Instituto do Câncer do Ceará sob número 1.315.571. (Anexo 1)

5.2 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo coorte retrospectivo, realizado nas Instituições acima citadas.

5.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A partir da revisão dos prontuários, foram identificados pacientes acompanhados no A.C.Camargo Cancer Center no período de 2008 a 2013 e no Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ) de 2004 a 2013, sem restrição quanto a sexo ou idade, tendo sido selecionados para o estudo os que respeitaram os critérios de inclusão descritos a seguir.

5.3.1 Critérios de inclusão

Os pacientes foram incluídos no grupo de acordo com as informações e/ou amostras disponíveis para avaliação. Desta forma, foram incluídos pacientes com laudo histopatológico confirmatório do diagnóstico de LHc emitido pelos Departamentos de Anatomia Patológica (DAP) de ambas as instituições, que foram tratados nas respectivas instituições e que dispunham de lâminas de hematoxilina e eosina (HE) e respectivas lâminas de imunohistoquímica (IHQ), bem como blocos de parafina disponíveis para confecção de *tissue microarray* (TMA).

5.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com diagnóstico de LHc sem confirmação posterior pela reavaliação histopatológica; pacientes portadores de outra neoplasia; pacientes sem blocos de parafina disponíveis ou pacientes com amostras pequenas, em que a confecção do TMA pudesse esgotar os blocos de parafina e pacientes com co-morbidades importantes (imunodeficiências, doenças debilitantes associadas).

5.4 RESGATE DE LÂMINAS E BLOCOS DE PARAFINA

Os pacientes que preencheram os critérios de seleção tiveram suas amostras referentes às lâminas de HE e IHQ, além dos blocos de parafina, solicitados aos arquivos dos DAP de ambas as instituições participantes.

5.5 FLUXOGRAMA DA SELEÇÃO DE PACIENTES DO A.C.CAMARGO CANCER CENTER, SP

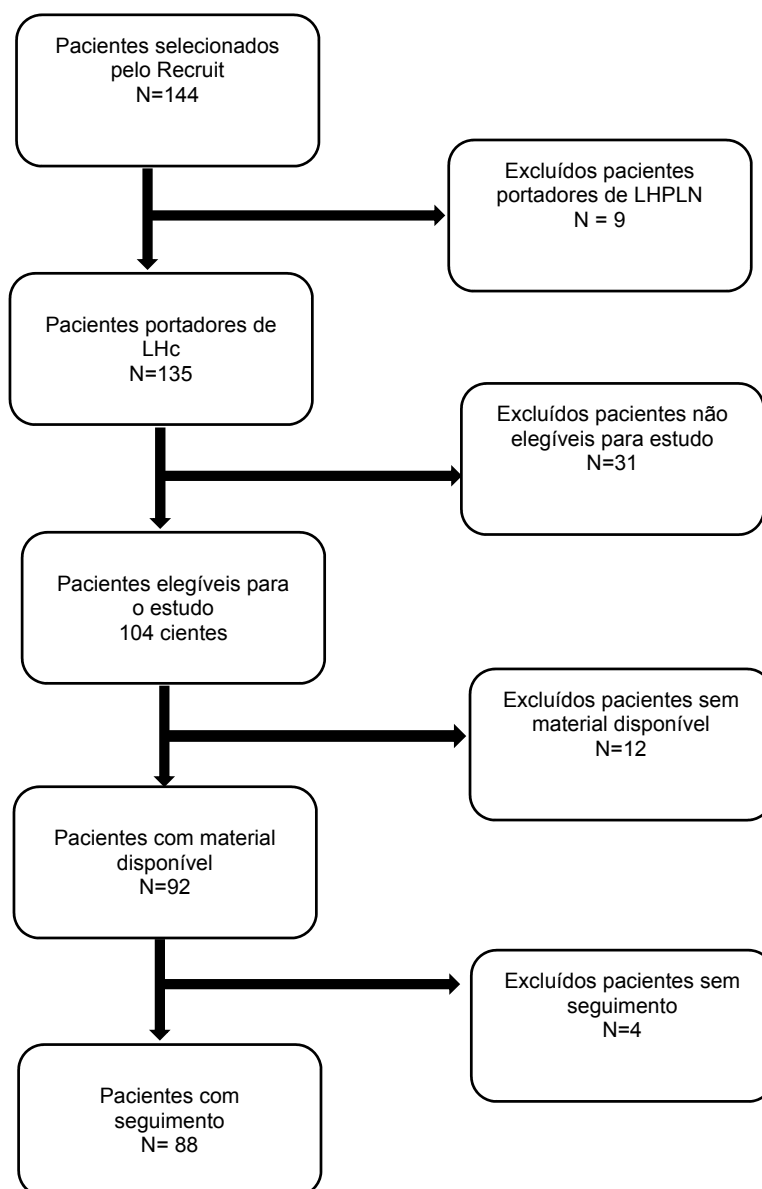


Figura 3 - Fluxograma da seleção dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center. Como são realizadas muitas pesquisas na instituição, muitos pacientes selecionados não dispunham de material suficiente nos blocos.

5.6 FLUXOGRAMA DA SELEÇÃO DE PACIENTES DO HOSPITAL HAROLDO JUAÇABA, FORTALEZA

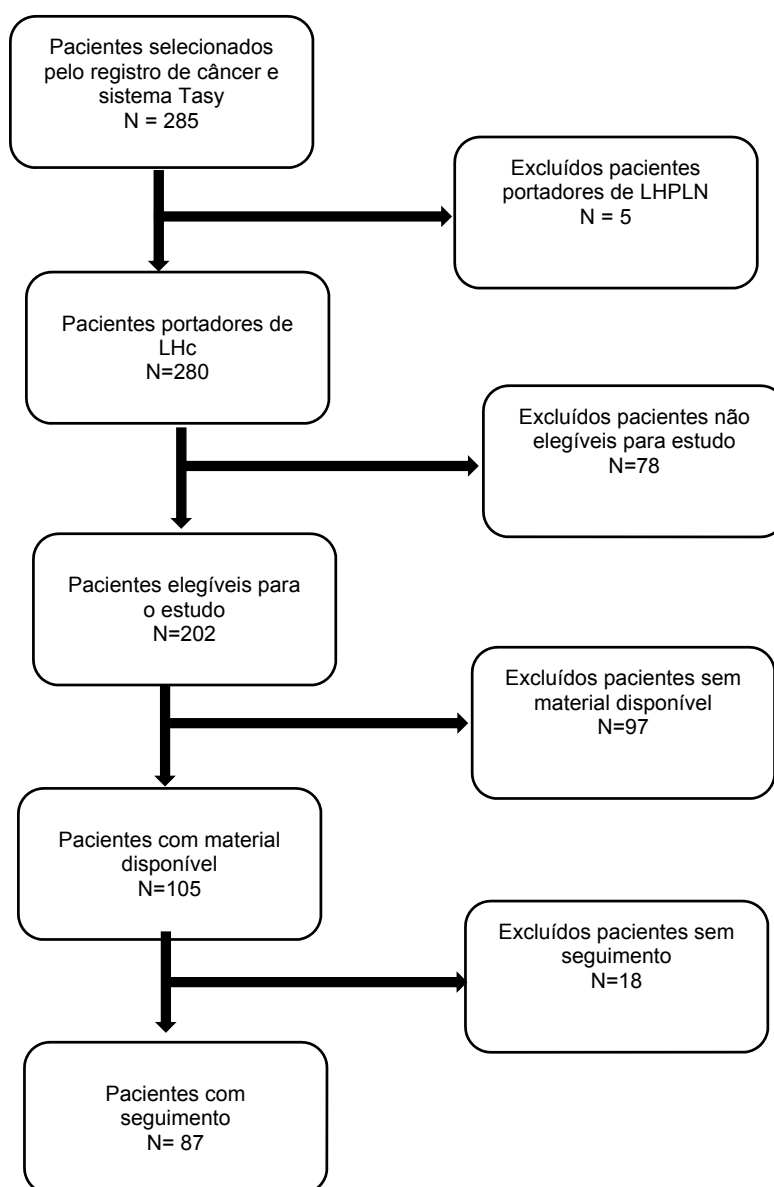


Figura 4 - Fluxograma da seleção dos pacientes do Hospital Haroldo Juaçaba. Como o serviço de patologia funciona como laboratório de apoio para outros hospitais, muitos pacientes diagnosticados no serviço não são tratados no hospital.

5.7 CONFEÇÃO DO *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

Para confecção do TMA foram selecionadas de cada amostra, duas áreas representativas do tumor, preferencialmente sem necrose, fibrose ou calcificação, tendo sido realizada marca das áreas selecionadas no bloco e lâmina respectivos. Posteriormente, utilizou-se o equipamento Beecher MT1 *manual arrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, *Silver Spring, MD*, Estados Unidos da América) para a confecção do TMA. A matriz foi construída com amostras de tumor com aproximadamente 1,0 mm de diâmetro cada.

5.8 REALIZAÇÃO DA IMUNOISTOQUÍMICA

Foram selecionados marcadores para estudar as subpopulações linfocitárias e os macrófagos, relacionados na Tabela 2.

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas.

Anticorpo anti-	Clone	Expressão celular relevante
CD3	2GV6	Célula T; célula NK
CD4	SP35	Célula T auxiliar e macrófago.
CD8	SP57	Célula T citotóxica
CD20	L26	Linfócitos B maduros.
CD68	KP1	Monócitos/macrófagos.
FOXP3	236 A/E7	Célula T auxiliar regulatória

As lâminas contendo os tecidos em matriz (TMAs) foram submetidas à reação de imunistoquímicas, segundo técnica padrão. Resumidamente, as lâminas de TMA foram desparafinadas em xilol e hidratadas em gradiente decrescente de álcool até chegar a água. Após a desparafinação, procedeu-se à inibição da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ a 3%) e, em seguida, à recuperação antigênica pelo calor. A recuperação antigênica foi realizada submergindo-se as lâminas com os tecidos em tampão Tris-EDTA, pH 9,0, em banho a 90° C por 40 minutos. Após a recuperação antigênica, aguardou-se o esfriamento das lâminas e procedeu-se à incubação dos cortes com os anticorpos primários relacionados na Tabela 2, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após retirada do anticorpo primário, foi realizada a detecção do mesmo através de um kit revelador da reação, à base de polímero ligado à peroxidase (Novolink, Leica Biosystems, *Newcastle*, Reino Unido) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, incubaram-se as lâminas com solução de diaminobenzidina. Após, as lâminas foram desidratadas e montadas de forma permanente em meio permanente. Após cada incubação, as lâminas foram lavadas com tampão Tris, pH 7,4. Controles positivos, com reatividade conhecida para cada marcador, foram utilizadas em cada corrida de reação. Controles negativos, sem incubação com o anticorpo primário, também foram utilizados.

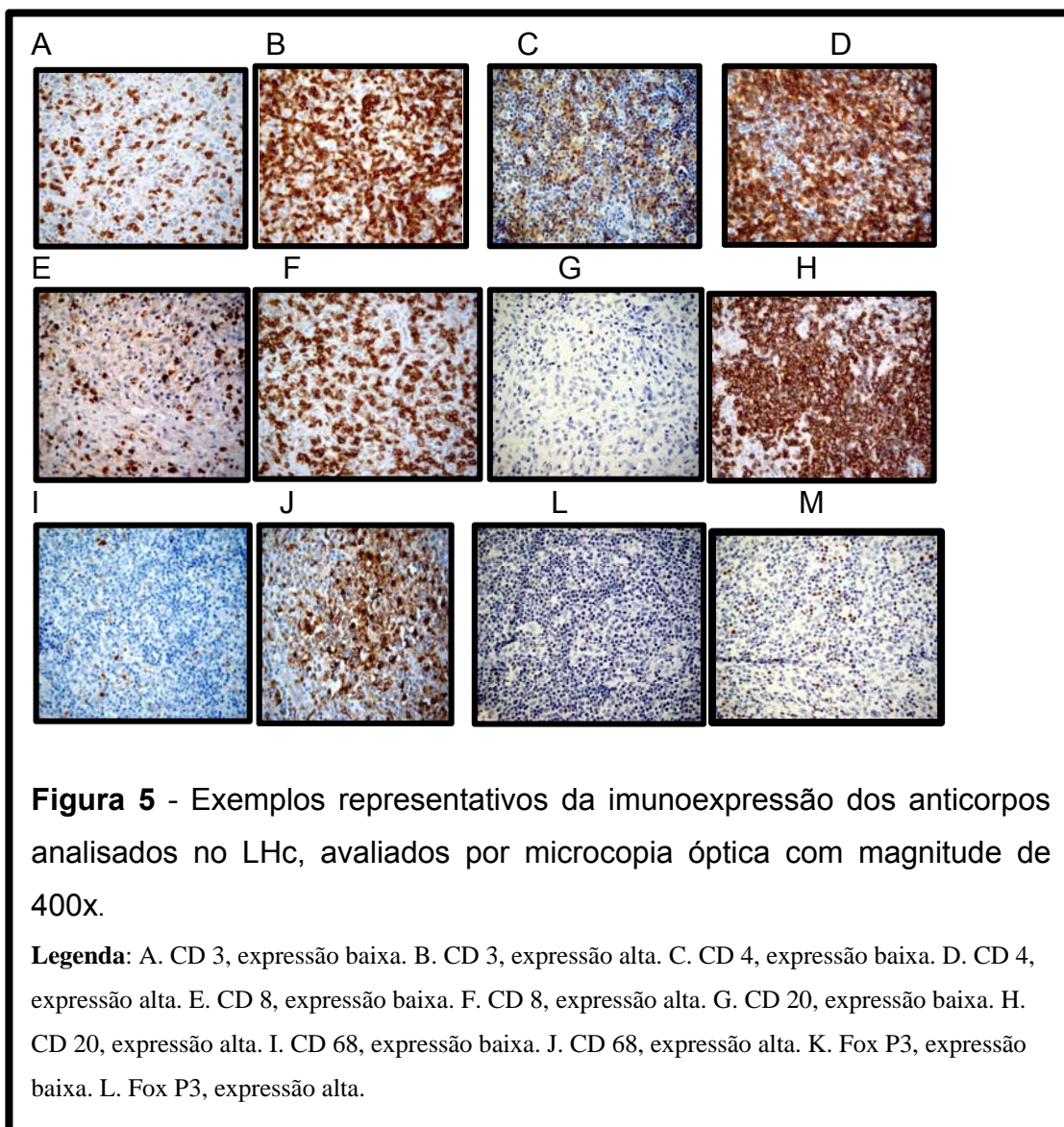
5.9 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* (CISH, DO INGLÊS *CHROMOGENIC IN SITU HYBRIDIZATION*) PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR

Para realização do CISH para detecção do EBV utilizou-se a sonda INFORM EBER (Ventana Medical Systems). Os cortes de tecido parafinado em matriz foram processados e corados pelo sistema automático da Ventana Benchmark, com o Kit Ventana ISHiVIEW (Roche Diagnostics, Tucson, AZ, Estados Unidos da América).

5.10 ANÁLISE DAS REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS DO TMA

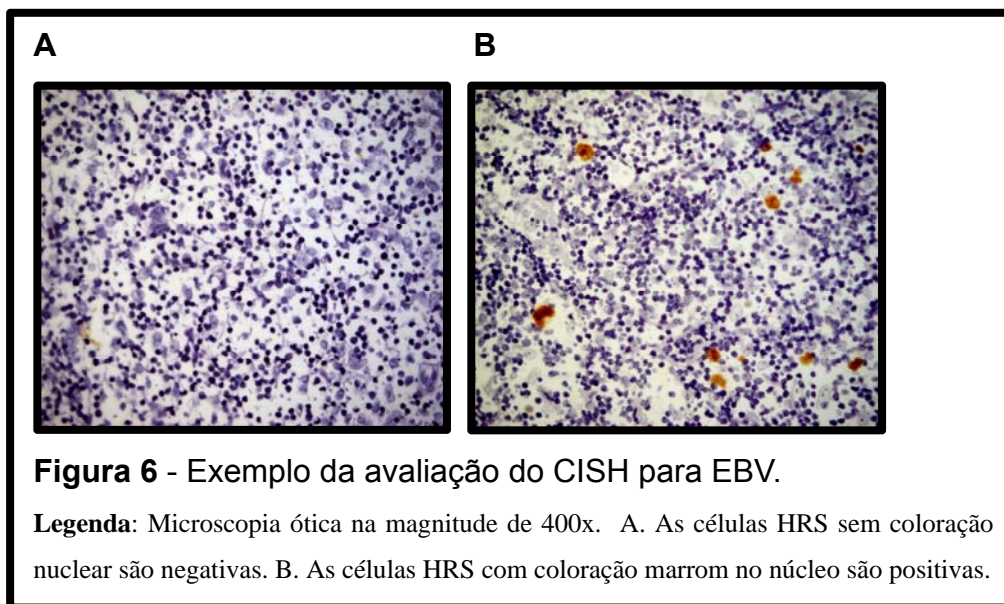
As lâminas submetidas à IHQ foram analisadas através de estimativa visual por dois patologistas (MP e CG). Essa estimativa percentual foi realizada para os marcadores para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3. Na estimativa visual, considerou-se a média ponderada do percentual dos marcadores entre CD20/CD3 e CD4/CD8 para estimar o total de linfócitos B/T e T CD4+/T CD8+, respectivamente. Para cada par desses marcadores, a somatória dos valores corresponde a 100%.

Utilizou-se a média aritmética entre os dois cilindros de tecidos correspondentes a cada caso, para cada anticorpo, exceto para os casos em que apenas uma das áreas estava disponível para avaliação, quando apenas a área preservada foi utilizada. A Figura 5 ilustra a expressão dos marcadores analisados.



5.11 ANÁLISE DO CISH PARA EBER

O resultado do CISH foi considerado positivo, quando uma ou mais células de HRS demonstrou coloração marrom. Os casos em que não houve marcação foram considerados negativos. Na Figura 6, há exemplo de reação negativa e positiva.



5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.12.1 Avaliação dos parâmetros clínicos e sobrevidas

Os pacientes tiveram os seguintes dados recuperados de seus prontuários: idade, sexo, estágio de Ann-Arbor, nível de hemoglobina, albumina sérica, leucometria e linfometria, parâmetros utilizados na classificação do IPS (sigla para International Prognostic Score). Além disso, foram avaliados o subtipo histológico, presença de doença *Bulky*, esquema quimioterápico, número de ciclos da quimioterapia e a realização de radioterapia. Os estádios foram agrupados em I/II e III/IV e estratificados como precoce ou avançado. Resposta completa foi considerada de acordo com os métodos disponíveis em cada instituição e documentada nos prontuários (exame clínico, tomografia computadorizada, tomografia de emissão de pósitrons e/ou exames anatomopatológicos). Progressão foi considerada como aumento do volume tumoral após início do tratamento, que necessitasse

mudança de tratamento ou acréscimo de tratamento adicional, antes do registro de remissão completa. Recidiva foi considerada quanto aumento do volume tumoral foi detectado após registro de remissão completa. Definimos nosso desfecho como sobrevida livre de eventos (SLE), sendo considerados para o cálculo da SLE tempo entre o início do tratamento e a recidiva/progressão ou a data do último seguimento do estudo. Para o cálculo da sobrevida global, consideramos os óbitos por LHc ou a data do último seguimento do estudo.

5.12.2 Tabulação de dados e testes estatísticos

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 20,0 para Windows no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%.

Os dados de imunoistoquímica foram expressos em forma de média e desvio-padrão, comparados entre si pelo teste de Kruskal-Wallis/Dunn ou Mann-Whitney (dados não paramétricos) e após traçado da mediana como ponto de corte de percentual de células imunomarcadas, os dados de imunoexpressão e demais dados clínico-patológicos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados quanto à recorrência/progressão pelo teste qui-quadrado de Pearson.

Foram calculados os tempos médios livres de eventos por meio de curvas de Kaplan-Meier para cada variável clínico-patológica e imuno-histoquímica, as quais foram comparadas pelo teste de Log-Rank Mantel-Cox.

A sobrevida livre de eventos foi calculada em meses através da diferença entre a data do último follow up e a data do diagnóstico (pacientes livres de eventos) ou a data em que foi diagnosticada recorrência/progressão e a data do diagnóstico (pacientes com evento). Após isso, as variáveis que mostraram associação $p < 0,200$ com o tempo livre de eventos ($p < 0,05$, teste de Log Rank Mantel Cox) foram analisadas por meio da regressão de Cox (análise multivariada) para estabelecimento dos fatores independentes preditivos de recorrência/progressão.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes de ambas as instituições participantes no que diz respeito a sexo, idade, estágio e presença de doença *Bulky*. Os pacientes do A.C.Camargo Cancer Center mostraram maior prevalência do tipo histológico LHEN que o HHJ. No HHJ, embora o subtipo LHEN seja o mais frequente, mostrou um percentual importante de casos de LHCM. A tabela 3 mostra o resumo dos dados.

Tabela 3 - Sumário dos dados clínicos e histopatológicos de pacientes portadores de LHC em dois centros oncológicos no Brasil.

	Hospital						p-Valor
	Total		AC Camargo		HHJ		
Sexo (n=176)	n = 176		n=89		n=87		
Feminino	93	52,8%	51	57,3%	42	48,3%	0,230
Masculino	83	47,2%	38	42,7%	45	51,7%	
Idade 45 (n=176)	n = 176						
< 45 anos	135	76,7%	65	73,0%	70	80,5%	0,244
≥ 45 anos	41	23,3%	24	27,0%	17	19,5%	
Subtipo histológico	n = 176						
CM	24	13,6%	3	3,4%	21*	24,1%	<0,001
EN	135	76,7%	80*	89,9%	55	63,2%	
PL	8	4,5%	5	5,6%	3	3,4%	
RL	9	5,1%	1	1,1%	8	9,2%	
Estadio de Ann-Arbor	n = 176						
I/II	96	54,5%	48	53,9%	48	55,2%	0,869
III/IV	80	45,5%	41	46,1%	39	44,8%	
Doença Bulky	n = 176						
Não	111	63,1%	60	67,4%	51	58,6%	0,227
Sim	65	36,9%	29	32,6%	36	41,4%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes dos dois centros em relação ao nível sérico de albumina, leucometria e linfometria. No entanto, os pacientes do HHJ mostraram maior frequência de baixo nível de hemoglobina. No que diz respeito a conduta terapêutica, não houve diferença significativa entre os dois centros em relação ao protocolo de quimioterapia utilizado e utilização de radioterapia. Entretanto, os pacientes do HHJ foram submetidos a um maior número de ciclos de quimioterapia que os pacientes do A.C.Camargo Cancer Center, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Sumário dos dados laboratoriais e conduta terapêutica de pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos no Brasil.

	Hospital						p-Valor
	Total	AC Camargo		HHJ			
Albumina sérica	n=147						
< 4	72	49,0%	28	46,7%	44	50,6%	0,641
≥ 4	75	51,0%	32	53,3%	43	49,4%	
Hemoglobina	n=176						
< 10,5	30	17,0%	5	5,6%	25	28,7%	<0,001
≥10,5	146	83,0%	84	94,4%	62	71,3%	
Leucometria	n=176						
< 15.000	157	89,2%	81	91,0%	76	87,4%	0,435
≥ 15.000	19	10,8%	8	9,0%	11	12,6%	
Linfometria	n=176						
< 600	16	9,1%	7	7,9%	9	10,3%	0,567
≥ 600	160	90,9%	82	92,1%	78	89,7%	
Sorologias	n=176						
Não	175	99,4%	88	98,9%	87	100,0%	0,321
Sim (Hepatite)	1	0,6%	1	1,1%	0	0,0%	
Protocolo de quimioterapia	n=176						
ABVD	170	96,6%	85	95,5%	85	97,7%	0,422
BE	6	3,4%	4	4,5%	2	2,3%	
Ciclos de quimioterapia	n=176						
Até 6	123	69,9%	70	78,7%	53	60,9%	0,010
>6	53	30,1%	19	21,3%	34	39,1%	
Radioterapia	n=168						
Não	78	46,4%	40	48,2%	38	44,7%	0,650
Sim	90	53,6%	43	51,8%	47	55,3%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

A resposta terapêutica ao tratamento quimioterápico e/ou radioterápico, não apresentou diferença significativa entre os dois centros oncológicos, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Avaliação da resposta terapêutica em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos no Brasil.

	Hospital						
	Total		AC Camargo		HHJ	p-Valor	
Resposta terapêutica	n=167						
RC	136	81,4%	69	84,1%	67	78,8%	0,376
RP/PD	31	18,6%	13	15,9%	18	21,2%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Quando avaliamos os parâmetros clínicos associados a sobrevida, encontramos que no A.C.Camargo Cancer Center, nenhum dos parâmetros avaliados influenciou a SLE (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre parâmetros clínicos e SLE em pacientes portadores de LHc no A.C.Camargo Cancer Center.

	A.C.Camargo Cancer Center				
	SLE em 3 anos	%	Média	IC 95%	p-Valor
Sexo	n=70				
Feminino	43	84,3%	31,96±1,38	29,26-34,65	0,125
Masculino	27	73,0%	27,69±2,22	23,34-32,05	
Idade					
< 45 anos	50	78,1%	29,69±1,50	26,74-32,63	0,718
≥ 45 anos	20	83,3%	31,67±2,09	27,56-35,77	
Histologia					
CM	3	100,0%	-	-	0,822
EN	62	78,5%	-	-	
PL	4	80,0%	-	-	
RL	1	100,0%	-	-	
Estagio					
I/II	41	85,4%	32,14±1,42	29,35-34,93	0,104
III/IV	29	72,5%	27,78±2,09	23,68-31,88	
Doença Bulky					
Não	49	83,1%	31,07±1,42	28,29-33,86	0,246
Sim	21	72,4%	28,51±2,37	23,87-33,15	

*p<0,05, teste de Log-Rank Mantel Cox (média ± EPM do tempo médio de sobrevida calculado por curvas de Kaplan-Meier).

Para os pacientes do HHJ, a SLE também não foi afetada por nenhum parâmetro clínico, como demonstra a Tabela 7.

Tabela 7 - Correlação entre parâmetros clínicos e SLE em pacientes portadores de LHc no HHJ.

HHC					
	SLE em 3 anos		Tempo médio de SLE		p-Valor
	n	%	Média	IC 95%	
Sexo	n=69				
Feminino	34	81,0%	32,23±1,40	29,49-34,97	0,578
Masculino	35	77,8%	29,19±1,90	25,46-32,92	
Idade					
< 45 anos	54	77,1%	30,31±1,36	27,66-32,97	0,347
≥ 45 anos	15	88,2%	32,25±2,49	27,38-37,12	
Histologia					
CM	19	90,5%	-	-	0,316
EN	40	72,7%	-	-	
PL	3	100,0%	-	-	
RL	7	87,5%	-	-	
Estagio					
I/II	38	79,2%	30,79±1,61	27,63-33,95	0,873
III/IV	31	79,5%	30,48±1,81	26,94-34,03	
Doença <i>Bulky</i>					
Não	44	86,3%	32,58±1,32	29,99-35,17	0,053
Sim	25	69,4%	27,96±2,14	23,77-32,14	

*p<0,05, teste de Log-Rank Mantel Cox (média ± EPM do tempo médio de sobrevivência calculado por curvas de Kaplan-Meier).

Para os pacientes do A.C. Camargo Cancer Center, a SLE em 36 meses foi influenciada pela hemoglobina, quantidade de ciclos de quimioterapia e a realização de radioterapia. A SLE foi maior nos pacientes com hemoglobina maior que 10,5d/l, tiveram até 6 ciclos de quimioterapia e realizaram radioterapia, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Correlação entre parâmetros laboratoriais, conduta terapêutica e SLE em pacientes portadores de LHc no A.C.Camargo Cancer Center.

A.C.Camargo Cancer Center					
	SLE em 3 anos		Tempo médio de SLE		
	n	%	Média	IC 95%	p-Valor
Albumina sérica	n=45				
< 4	20	71,4%	28,32±2,41	23,60-33,04	0,365
≥ 4	25	80,6%	30,67±1,96	26,82-34,52	
Hemoglobina	n=70				
< 10,5	1	20,0%	12,40±5,38	1,86-22,94	0,001
≥ 10,5	69	83,1%	31,34±1,16	29,06-33,62	
Leucometria	n=70				
< 15,000	64	80,0%	30,36±1,29	27,83-32,89	0,801
≥ 15,000	6	75,0%	29,00±4,29	20,60-37,40	
Linfometria	n=70				
< 600	4	57,1%	22,17±5,81	10,77-33,56	0,053
≥ 600	66	81,5%	30,85±1,23	28,45-33,26	
Protocolo de quimioterapia	n=70				
ABVD	67	79,8%	30,11±1,28	27,60-32,62	0,735
BE	3	75,0%	33,67±1,91	29,93-37,40	
Ciclos de quimioterapia	n=70				
Até 6	59	85,5%	31,85±1,25	29,40-34,31	0,014
>6	11	57,9%	24,65±3,07	18,64-30,67	
Radioterapia	n=67				
Não	27	67,5%	26,00±2,25	21,59-30,42	0,001
Sim	40	93,0%	34,53±0,91	32,75-36,31	

*p<0,05, teste de Log-Rank Mantel Cox (média ± EPM do tempo médio de sobrevida calculado por curvas de Kaplan-Meier).

A SLE dos pacientes do HHJ não sofreu influencia de nenhum parâmetro laboratorial ou terapeutico, como visto na Tabela 9.

Tabela 9 - Correlação entre parâmetros laboratoriais, conduta terapêutica e SLE em pacientes portadores de LHc no HHJ.

HHJ					
	SLE em 3 anos		Tempo médio de SLE		
	n	%	Média	IC 95%	p-Valor
Albumina sérica	n=69				
< 4	33	75,0%	29,20±1,86	25,55-32,85	0,227
≥ 4	36	83,7%	32,07±1,50	29,12-35,01	
Hemoglobina	n=69				
< 10,5	17	68,0%	28,96±2,24	24,56-33,36	0,100
≥ 10,5	52	83,9%	31,36±1,40	28,61-34,11	
Leucometria	n=69				
< 15,000	60	78,9%	30,81±1,26	28,35-33,27	0,981
≥ 15,000	9	81,8%	29,65±4,00	21,81-37,49	
Linfometria	n=69				
< 600	6	66,7%	30,00±3,34	23,45-36,55	0,337
≥ 600	63	80,8%	30,76±1,28	28,26-33,26	
Protocolo de quimioterapia	n=69				
ABVD	68	80,0%	30,90±1,19	28,56-33,24	0,283
BP	1	50,0%	22,00±9,90	2,60-41,40	
Ciclos de quimioterapia	n=69				
Até 6	45	84,9%	31,24±1,56	28,18-34,30	0,144
>6	24	70,6%	29,77±1,86	26,12-33,42	
Radioterapia	n=69				
Não	31	81,6%	31,62±1,63	28,43-34,81	0,675
Sim	36	76,6%	29,74±1,75	26,31-33,18	

*p<0,05, teste de Log-Rank Mantel Cox (média ± EPM do tempo médio de sobrevida calculado por curvas de Kaplan-Meier).

6.2 CARACTERÍSTICAS DO MICROAMBIENTE TUMORAL

Ao analisarmos o percentual de linfócitos e macrófagos presentes no microambiente do LHc, evidenciamos um predomínio de células CD 3, CD 4 e CD 8 em relação a células CD 20 e CD 68. O percentual de células expressando FoxP3 foi significativamente inferior aos demais marcadores, como evidenciado pela Figura 7.

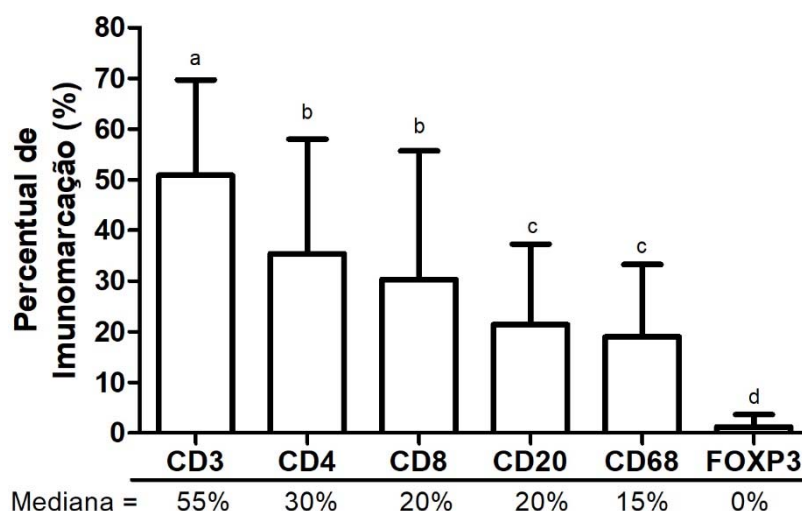


Figura 7 - Mediana do percentual de linfócitos e macrófagos avaliados por estimativa visual no microambiente tumoral do LHc.

Legenda: Dados expressos em forma de média \pm desvio-padrão; * $p < 0,05$, diferença significativa entre centros hospitalares. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

A análise dos achados do microambiente demonstrou que não houve diferença significativa entre os dois centros entre o percentual de células que expressaram CD20, CD68 e FOXP3. Entretanto, os pacientes do HHJ tiveram um maior percentual de células que expressaram CD3, CD4 e CD8, como observado na Tabela 10.

Tabela 10 - Sumário do percentual de linfócitos e macrófagos avaliados por estimativa visual no microambiente tumoral do LHC em dois centros oncológicos.

	Hospital						p-Valor
	Total	AC Camargo		HHJ			
CD3 (n=169)							
< 55%	86	50,9%	65*	75,6%	21	25,3%	<0,001
>55%	83	49,1%	21	24,4%	62*	74,7%	
CD4 (n=167)							
< 30%	79	47,3%	64*	74,4%	15	18,5%	<0,001
>30%	88	52,7%	22	25,6%	66*	81,5%	
CD8 20 (n=169)							
< 20%	86	50,9%	79*	91,9%	7	8,4%	<0,001
>20%	83	49,1%	7	8,1%	76*	91,6%	
CD20 (n=171)							
< 20%	91	53,2%	50	56,8%	41	49,4%	0,331
>20%	80	46,8%	38	43,2%	42	50,6%	
CD68 (n=167)							
< 15%	82	49,1%	40	46,0%	42	52,5%	0,400
>15%	85	50,9%	47	54,0%	38	47,5%	
FOXP3 (n=172)							
0%	111	64,5%	51	58,6%	60	70,6%	0,101
>0%	61	35,5%	36	41,4%	25	29,4%	

*p<0,05, teste de Log-Rank Mantel Cox (média ± EPM do tempo médio de sobrevivência calculado por curvas de Kaplan-Meier).

A Figura 8 ilustra bem essa diferença significativa entre o percentual de células que expressaram CD3, CD4 e CD8, nas duas populações estudadas.

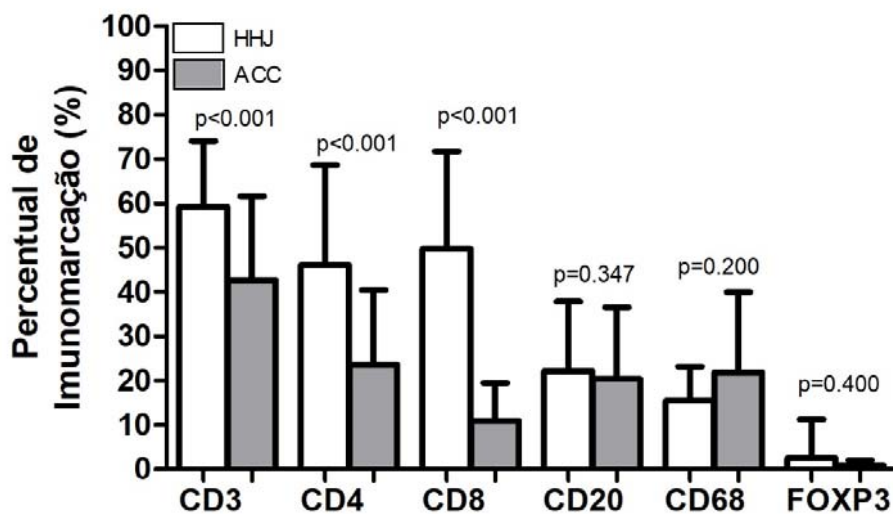


Figura 8 - Mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHC em dois centros oncológicos.

Legenda: Dados expressos em forma de média \pm desvio-padrão; *p<0,05, diferença significativa entre centros hospitalares. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

Quando avaliamos a SLE em relação aos achados de microambiente de cada população, encontramos que o microambiente tumoral não influencia a SLE dos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center, como mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Correlação entre o percentual de linfócitos e macrófagos no microambiente tumoral do LHc e SLE no A.C.Camargo Cancer Center.

A.C.Camargo Cancer Center					
	SLE em 3 anos		Tempo médio de SLE		p-Valor
	n	%	Média	IC 95%	
CD3					
Até 55%	53	81,5%	30,45±1,45	27,61-33,29	0,341
>55%	14	70,0%	28,62±2,66	23,41-33,83	
CD4					
Até 30%	53	82,8%	30,95±1,39	28,23-33,68	0,117
>30%	14	66,7%	27,15±2,88	21,50-32,80	0,262
CD8					
Até 20%	61	78,2%	29,93±1,33	27,32-32,53	0,748
>20%	6	85,7%	31,00±4,56	22,05-39,95	
CD20					
Até 20%	37	75,5%	28,97±1,81	25,42-32,52	0,279
>20%	32	84,2%	31,61±1,65	28,37-34,85	
CD68					
Até 15%	30	76,9%	29,61±1,89	25,90-33,31	0,812
>15%	38	80,9%	30,52±1,69	27,20-33,84	
FOXP3					
0%	39	78,0%	29,62±1,70	26,29-32,95	0,767
>0%	29	80,6%	30,71±1,88	27,03-34,39	
CD20/CD3					
Até 3	38	80,9%	30,37±1,68	27,07-33,68	0,758
>3	31	77,5%	29,89±1,87	26,22-33,55	
CD8 CD4					
Até 1,5	24	80,0%	29,62±2,31	25,10-34,14	0,942
>1,5	43	78,2%	30,25±1,52	27,27-33,24	

*p<0,05, teste de Log-Rank Mantel Cox (média ± EPM do tempo médio de sobrevida calculado por curvas de Kaplan-Meier).

Entretanto, para os pacientes do HHJ, a SLE em 36 meses está associada à maior número de células expressando CD 3 e CD 20, como mostra a Tabela 12.

Tabela 12 - Correlação entre o percentual de linfócitos e macrófagos no microambiente tumoral do LHc e SLE no HHJ.

	HHJ				
	SLE em 3 anos		Tempo médio de SLE		
	n	%	Média	IC 95%	p-Valor
CD3					
Até 55%	14	66,7%	26,64±3,03	20,71-32,57	0,020
>55%	54	87,1%	32,57±1,18	30,25-34,88	
CD4					
Até 30%	11	73,3%	28,07±3,37	21,46-34,68	0,262
>30%	56	84,8%	31,78±1,27	29,29-34,27	
CD8					
Até 20%	6	85,7%	33,00±2,78	27,56-38,44	0,738
>20%	62	81,6%	30,96±1,28	28,46-33,46	
CD20					
Até 20%	30	73,2%	28,88±1,96	25,04-32,72	0,042
>20%	38	90,5%	33,38±1,27	30,89-35,86	
CD68					
Até 15%	35	83,3%	31,40±1,62	28,23-34,58	0,721
>15%	31	81,6%	30,65±1,88	26,96-34,34	
FOXP3					
0%	50	83,3%	31,93±1,31	29,35-34,50	0,193
>0%	18	72,0%	27,87±2,62	22,73-33,00	
CD20/CD3					
Até 3	36	87,8%	32,58±1,46	29,72-35,43	0,149
>3	32	76,2%	29,68±1,86	26,04-33,33	
CD8 CD4					
Até 1,5	45	81,8%	31,31±1,43	28,51-34,11	0,912
>1,5	23	82,1%	30,79±2,14	26,59-34,98	

*p<0,05, teste de Log-Rank Mantel Cox (média ± EPM do tempo médio de sobrevida calculado por curvas de Kaplan-Meier).

6.3 STATUS DO EBV

Quando avaliamos o total da população, a maioria dos pacientes portadores de LHC não demonstra positividade para EBV. Entretanto, há uma diferença significativa entre as populações. A positividade para EBV avaliada por CISH foi acentuadamente maior nos pacientes do HHJ (Tabela 13).

Tabela 13 - Positividade para EBV avaliada por CISH em pacientes portadores de LHC em dois centros oncológicos.

	HOSPITAL						p-valor
	Total		A.C. Camargo Cancer Center		HHJ		
CISH	n=138		n=65		n=73		
Negativo	106	76,8%	59*	90,8%	47	64,4%	<0,001
Positivo	32	23,2%	6	9,2%	26*	35,6%	

*p<0,05, teste qui-quadrado; dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Legenda: CISH: hibridização *in situ* cromogênica.

Quando analisamos o status do EBV com parâmetros clínicos, observamos que para os pacientes do A.C. Camargo Cancer Center, a positividade para EBV esteve associada a pacientes maiores que 45 anos. Já para os pacientes do HHJ, a positividade para EBV está associada a subtipos histológicos diferentes de LHEN. Nos pacientes do HHJ, também observamos que os pacientes positivos para EBV mostraram menor associação com doença *Bulky*, como visto na Tabela 14.

Tabela 14 - Correlação entre parâmetros clínicos e o status de EBV em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos.

HOSPITAL										
	A.C.Camargo Cancer Center				p-Valor	HHJ				p-Valor
	Negativo		Positivo			Negativo		Positivo		
Sexo										
Feminino	35	59,3%	2	33,3%	0,221	24	51,1%	11	42,3%	0,473
Masculino	24	40,7%	4	66,7%		23	48,9%	15	57,7%	
Idade										
< 45 anos	46*	78,0%	2	33,3%	0,018	39	83,0%	18	69,2%	0,174
≥ 45 anos	13	22,0%	4*	66,7%		8	17,0%	8	30,8%	
Histologia										
CM	1	1,7%	2*	33,3%	0,005	8	17,0%	13*	50,0%	0,023
EN	52*	88,1%	4	66,7%		33*	70,2%	10	38,5%	
PL	5	8,5%	0	0,0%		1	2,1%	1	3,8%	
RL	1	1,7%	0	0,0%		5	10,6%	2	7,7%	
Doença Bulky										
Não	44	74,6%	4	66,7%	0,674	22	46,8%	21*	80,8%	0,005
Sim	15	25,4%	2	33,3%		25*	53,2%	5	19,2%	
Protocolo de quimioterapia										
ABVD	57	96,6%	6	100,0%	0,647	46	97,9%	26	100,0%	0,454
Outros	2	3,4%	0	0,0%		1	2,1%	0	0,0%	
Ciclos de quimioterapia										
Até 6	43	72,9%	5	83,3%	0,579	27	57,4%	19	73,1%	0,185
>6	16	27,1%	1	16,7%		20	42,6%	7	26,9%	
RT										
Não	26	48,1%	4	66,7%	0,389	20	43,5%	13	52,0%	0,492
Sim	28	51,9%	2	33,3%		26	56,5%	12	48,0%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

O status do EBV não mostrou relação com nenhum dos dados laboratoriais estudados, como mostra a Tabela 15.

Tabela 15 - Correlação entre parâmetros laboratoriais e o status de EBV em pacientes portadores de LHC em dois centros oncológicos.

	Hospital									
	A.C.Camargo Cancer Center				p-Valor	HHJ				p-Valor
	Negativo		Positivo			Negativo		Positivo		
Albumina sérica										
< 4	16	40,0%	3	75,0%	0,178	23	48,9%	14	53,8%	0,688
≥ 4	24	60,0%	1	25,0%		24	51,1%	12	46,2%	
Hemoglobina										
< 10,5	2	3,4%	1	16,7%	0,140	10	21,3%	8	30,8%	0,368
≥ 10,5	57	96,6%	5	83,3%		37	78,7%	18	69,2%	
Leucometria										
< 15.000	53	89,8%	6	100,0%	0,412	39	83,0%	24	92,3%	0,267
≥ 15.000	6	10,2%	0	0,0%		8	17,0%	2	7,7%	
Linfometria										
< 600	3	5,1%	0	0,0%	0,572	4	8,5%	3	11,5%	0,674
≥ 600	56	94,9%	6	100,0%		43	91,5%	23	88,5%	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Quando avaliamos os dados de microambiente, notamos que os pacientes EBV positivos tiveram uma expressão de CD 8 acentuadamente maior, como evidenciado pela Figura 9.

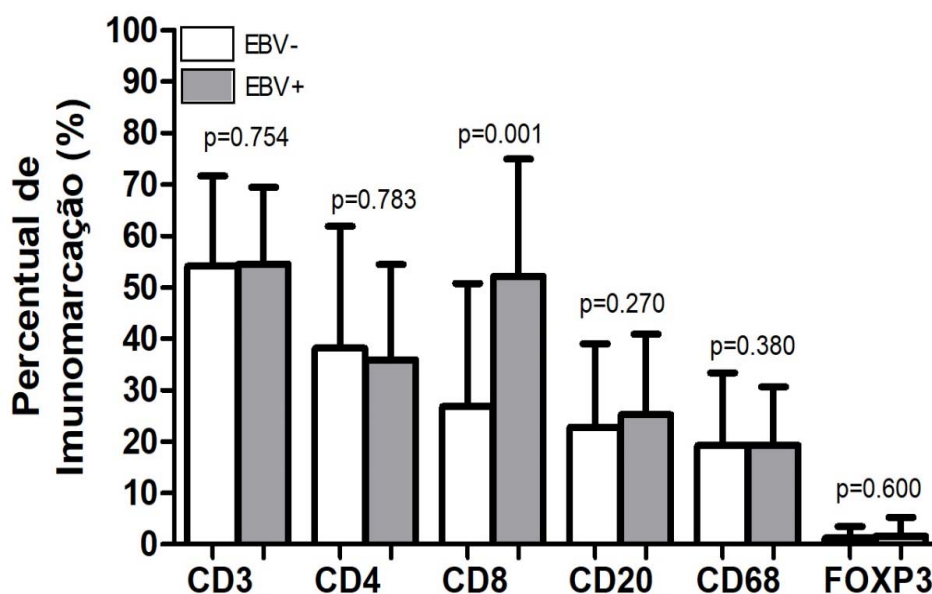


Figura 9 - Correlação entre o status do EBV e mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHC em dois centros oncológicos.

Legenda: Dados expressos em forma de média \pm desvio-padrão; * $p < 0,05$, diferença significativa entre centros hospitalares. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

Quando avaliamos as populações em separado, os achados são semelhantes. Nos pacientes do A.C. Camargo Cancer Center com positividade para EBV, o microambiente tumoral teve maior número de células CD 8 positivas, como mostrado na Figura 10.

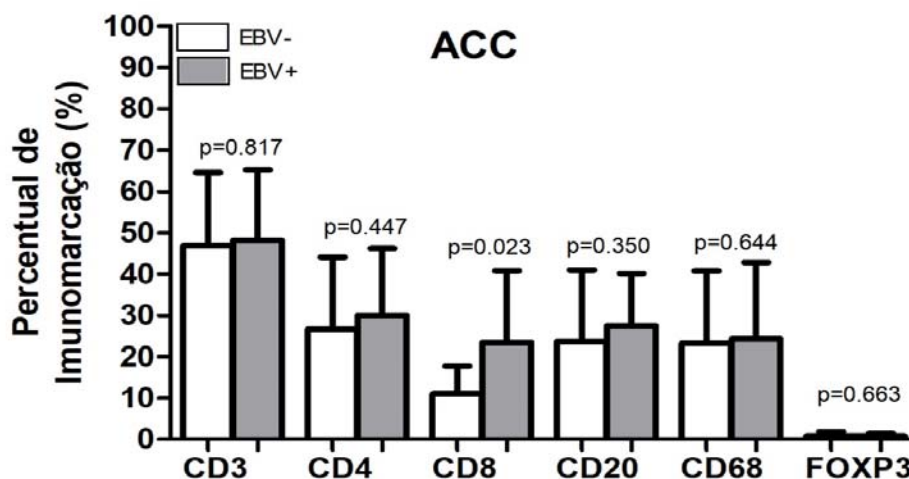


Figura 10 - Correlação entre o status do EBV e mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHC no A.C.Camargo Cancer Center.

Legenda: Dados expressos em forma de média \pm desvio-padrão; * $p < 0,05$, diferença significativa entre centros hospitalares. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

O mesmo padrão é visto nos pacientes do HHJ, como a Figura 11 ilustra.

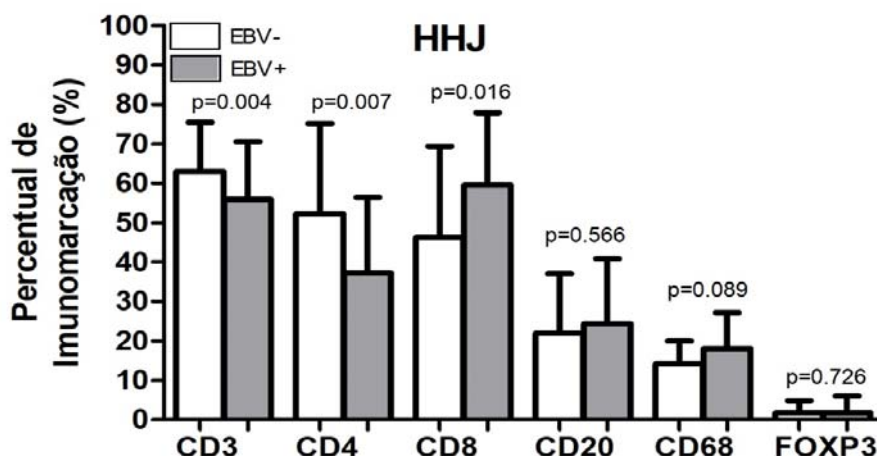


Figura 11 - Correlação entre o status do EBV e mediana do percentual de células positivas para CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 e FOXP3 no microambiente tumoral do LHc no HHJ.

Legenda: Dados expressos em forma de média \pm desvio-padrão; * $p < 0,05$, diferença significativa entre centros hospitalares. Teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

A positividade para EBV não influenciou a SLE em nenhuma das populações estudadas. Os pacientes do HHJ, apesar do grande número de casos positivos para EBV, essa frequência alta não influenciou a SLE, como evidenciado pela Tabela 16.

Tabela 16 - Correlação entre SLE e o status de EBV em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos.

	HOSPITAL					
	A.C.Camargo Cancer Center			HHJ		
	SLE em 3 anos			SLE em 3 anos		
	n	%	p-Valor	n	%	p-Valor
CISH						
Negativo	47	81,0%	0,834	36	76,6%	0,086
Positivo	5	83,3%		24	92,3%	

* $p < 0,05$, teste de Log-Rank Mantel Cox (média \pm EPM do tempo médio de sobrevivência calculado por curvas de Kaplan-Meier).

6.4 FATORES PREDITIVOS E SOBREVIDA

Em análise multivariada, para ambas as populações, resposta terapêutica parcial/progressão da doença mostrou-se como preditor de menor SLE. Demais parâmetros clínicos e laboratoriais avaliados não influenciaram a SLE. Da mesma forma, os achados do microambiente tumoral não influenciaram a SLE para os pacientes do A.C.Camargo Cancer Center. Para os pacientes do HHJ, um maior número de células expressando CD 20, está associado a melhor SLE, como demonstrado nas Tabelas 17 e 18.

Tabela 17 - Análise multivariada de fatores preditivos de SLE em pacientes portadores de LHc no A.C.Camargo Cancer Center.

	A.C.Camargo Cancer Center							
	p-Valor	HR	IC 95%		p-valor	HR	IC 95%	
HAZARD RISK								
Sexo	0,854	1,11	0,35	3,54	0,611	1,60	0,26	9,81
Doença Bulky	0,575	1,37	0,45	4,18	0,206	4,80	0,42	54,59
Albumina sérica	0,159	2,48	0,70	8,82	0,114	44,47	0,40	489,83
Hemoglobina	0,519	1,55	0,41	5,82	0,919	1,01	0,12	12,10
Linfometria	0,725	1,41	0,21	9,46	0,995	1,52	0,15	17,72
Ciclos	0,327	1,89	0,53	6,78	0,108	22,40	0,30	166,10
Radioterapia	0,194	0,46	0,14	1,48	0,278	7,99	0,19	342,36
Resposta terapêutica	<0,001	98,67	18,00	540,99	0,033	25,96	1,30	518,58
CD20	0,042	3,03	1,03	10,08	0,083	14,75	0,70	308,97
EBV	0,187	3,02	0,59	15,59	0,920	0,97	0,22	9,87

*p<0,05, regressão de Cox

Legenda: Sexo masculino; Albumina sérica < 4; Hemoglobina < 10,5g/dl; Linfometria ≥ 600; Radioterapia: não realizar; Ciclos: (>6); Resposta terapêutica: RP/PD; CD 20: < 20%; EBV: negativo.

Tabela 18 - Análise multivariada de fatores preditivos de SLE em pacientes portadores de LHc no HHJ.

HHJ								
	p-Valor	HR	IC 95%		p-Valor	HR	IC 95%	
HAZARD RISK								
Sexo	0,854	1,11	0,35	3,54	0,592	1,72	0,24	489,83
Doença Bulky	0,575	1,37	0,45	4,18	0,626	1,56	0,26	9,20
Albumina sérica	0,159	2,48	0,70	8,82	0,331	3,79	0,26	489,83
Hemoglobina	0,519	1,55	0,41	5,82	0,367	2,73	0,31	489,83
Linfometria	0,725	1,41	0,21	9,46	0,402	3,39	0,20	489,83
Ciclos	0,327	1,89	0,53	6,78	0,382	2,76	0,28	489,83
Radioterapia	0,194	0,46	0,14	1,48	0,112	4,97	0,69	35,89
Resposta terapêutica	<0,001	98,67	18,00	540,99	<0,001	374,54	16,92	829,76
CD20	0,042	3,03	1,03	10,08	0,020	25,60	1,68	489,83
EBV	0,187	3,02	0,59	15,59	0,706	1,65	0,12	21,87

*p<0,05, regressão de Cox

Legenda: Sexo masculino; Albumina sérica < 4; Hemoglobina < 10,5g/dl; Linfometria ≥ 600; Radioterapia: não realizar; Ciclos: (>6); Resposta terapêutica: RP/PD; CD 20: < 20%; EBV: negativo.

A SLE da população geral, avaliada em 36 meses foi de 79,4%, sem diferença estatística entre as duas populações, como evidenciado na Tabela 19.

Tabela 19 - Sobrevida livre de eventos (SLE) avaliada em 36 meses em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos.

	SLE em 3 anos		Tempo médio de SLE		p-Valor
	n	%	Média	IC 95%	
Toda a amostra	139	79,4%	30,45±0,86	28,77-32,14	-
Hospital					
AC Camargo	70	79,5%	30,23±1,24	27,80-32,65	0,966
HHJ	69	79,3%	30,68±1,20	28,34-33,03	

As duas populações estudadas também não apresentaram diferenças na sobrevida global quando avaliadas no período de 36 meses, como mostrado na tabela abaixo.

Tabela 20 - Sobrevida global avaliada em 36 meses em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos

	Sobrevida global em 3 anos		Tempo médio de sobrevida livre de doença		p-Valor
	n	%	Média	IC 95%	
Toda a amostra	157	89,2%	33,21±0,65	31,90-34,47	-
Hospital					
AC Camargo	79	88,8%	32,88±1,24	30,85-34,05	0,676
HHJ	68	89,7%	32,79±1,20	31,42-34,03	

A sobrevida global da totalidade da população estudada foi de 89,2%, como mostrado na Figura 12.

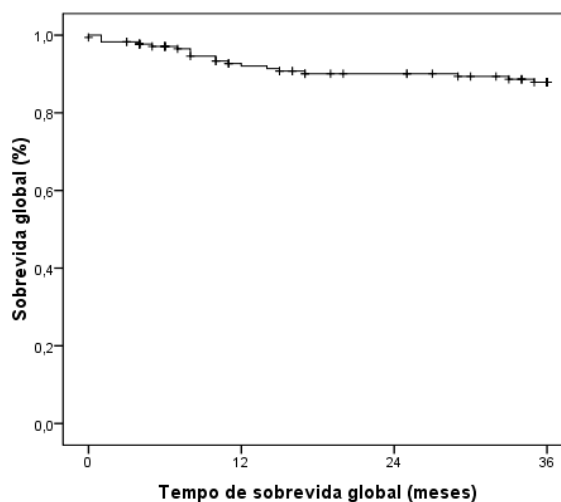


Figura 12 - Curva de sobrevida global avaliada em 36 meses em pacientes portadores de LHc em dois centros oncológicos.

7 DISCUSSÃO

7.1 ACHADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Este estudo avaliou o LHc em duas populações brasileiras provenientes de regiões geográficas distintas, que têm grandes diferenças no clima, composição étnica da população, atividade econômica e nível socioeconômico. Os dados clínicos, o sexo e a idade foram avaliados e comparados, bem como as células que compõem o microambiente tumoral. Embora tenhamos estudo anterior avaliando essas duas populações (ELGUI DE OLIVEIRA et al. 2002), considerável intervalo de tempo se passou entre estes estudos. Nesse interim, o país passou por modificações econômicas, novas tecnologias para o diagnóstico foram inseridas e novas opções terapêuticas foram disponibilizadas para os casos recorrentes/refratários.

Quando analisamos os achados clínicos e patológicos do total dos casos estudados, sem individualizarmos por região, há similaridade em relação a outros estudos publicados, especialmente no que diz respeito aos subtipos histológicos, infecção por EBV e idade. Em estudo publicado em 2001, LHEN correspondia a 50,4% dos casos de LHc, seguido pelo subtipo celularidade mista, que correspondia a 34,6% VASSALLO et al. (2001). Em 2005, os casos estudados, o subtipo esclerose nodular foi responsável por 69,2% dos diagnósticos e o LHCM ficou com 21,1% dos diagnósticos de LHc (VASSALLO et al. 2005). Em recente estudo publicado, o percentual de casos

de LHEN foi de 77% e os demais subtipos foram responsáveis por 23% dos casos de LHc (BIASOLI et al. 2018).

Da mesma forma, quando avaliamos na totalidade dos casos, os dados de subtipo histológico e presença de infecção por EBV são muito semelhante aos encontrados nos estudos epidemiológicos mais recentes descritos no Brasil, mostrando que o número de casos EBV positivo estão em importante queda, principalmente na população mais jovem (CAMPOS et al. 2018) e sugere que o perfil epidemiológico do país está se modificando e tornando-se mais próximo de países desenvolvidos (MOZAHEB 2013).

Entretanto, quando analisamos cada população em separado, há resultados estatisticamente significativos obtidos em relação aos subtipos histológicos. Considerando a amostra proveniente do A.C.Camargo Cancer Center (região Sudeste, mais desenvolvida) e a população do HHJ (região Nordeste, menos desenvolvida), a prevalência do subtipo esclerose nodular favorece os dados epidemiológicos que esse subtipo é mais frequente em populações de países desenvolvidos. E que o subtipo celularidade mista tem mais alta frequência em países em desenvolvimento, que no nosso estudo é representada pelos pacientes da região Nordeste/HHJ (HSU e GLASER 2000; MOZAHEB 2013).

Vale ressaltar que os dados mostram uma mudança significativa neste perfil, considerando que há poucos anos, em um estudo que avaliava pacientes oriundos dessas duas regiões (Sudeste e Nordeste), o LHCM foi o subtipo mais comum, sendo responsável por 58,3% dos casos de LHC

seguido pelo subtipo LHEN com 29,1% dos casos (ELGUI DE OLIVEIRA et al. 2002)

Os resultados do CISH para EBV também reforçam uma mudança no perfil epidemiológico da população brasileira. Estudos prévios na população brasileira mostravam uma alta frequência de infecção por EBV nos pacientes portadores de LHc. Estudos publicados em 2001 e 2004 respectivamente, mostram uma positividade de 64,1% e 55,0% (Vassalo et al., 2001). Estudos mais recentes mostram uma queda nesse percentual. Em uma publicação de 2016, 37,9% dos casos de LHc foram positivos para EBV (HALLACK NETO et al. 2016). Em 2018, uma análise mais ampla realizada avaliando hospitais de referência no Estado de São Paulo, mostrou que a média de casos positivos passou a ser de 46%, na população geral, e 32% na população mais jovem. Esses dados possivelmente refletem uma melhor condição socioeconômica (CAMPOS et al. 2018).

A relação da infecção por EBV com o subtipo LHCM é mostrada nesses estudos. Nossos dados também confirmaram essa relação. Os pacientes provenientes da região Nordeste tiveram números muito superiores ao do Sudeste quanto à positividade para EBV. Da mesma forma, na população do Nordeste, apesar do predomínio de LHEN, 25% dos casos ainda é representado por LHCM, reforçando a relação entre subtipo Celularidade Mista com positividade para EBV, provavelmente refletindo o ainda baixo nível socioeconômico dessa população (ELGUI DE OLIVEIRA et al. 2002; CAMPOS et al. 2018).

Entretanto, essa positividade para EBV, que foi mostrada significância estatística entre os pacientes dos dois centros, não impactou a SLE.

Dos achados laboratoriais, chama atenção o nível de hemoglobina que foi significativamente mais baixo na população do HHJ. Na análise univariada, uma taxa de hemoglobina menor que 10,5g/dl influenciou negativamente a SLE nos pacientes do A.C.Camargo Cancer Center. Entretanto, na análise multivariada esse parâmetro perdeu a importância.

Apesar da diferença socioeconômica entre os dois centros, não houve mudança dos esquemas de tratamento entre as duas instituições, tampouco com o desfecho. O esquema ABVD foi o mais utilizado nos dois centros. E nos casos de recidiva e/ou progressão, os esquemas de quimioterapia de segunda linha foram os mesmos, refletindo a utilização de protocolos internacionais nesses pacientes. Há uma diferença na realização de radioterapia, possivelmente associado ao maior percentual de pacientes com doença *Bulky* na população do Nordeste. Nossos dados são consistentes com as mais recentes publicações abordando a epidemiologia do LH no Brasil, que mostram predomínio do subtipo LHEN e o ABVD como esquema quimioterápico mais frequentemente utilizado para o LH (BIASOLI et al. 2018; BUCCHERI et al. 2018; DA SILVEIRA et al. 2018).

7.2 ACHADOS DO MICROAMBIENTE TUMORAL

Os achados do microambiente foram intrigantes. Não houve diferença significativa na imunexpressão de CD 20, CD 68 e Fox P3 entre as duas populações. Entretanto, um maior número de células expressando CD 20 está

associado a maior SLE para a população do HHJ, tanto na análise univariada quanto na análise multivariada. Mas não houve diferenças entre a SLE entre as duas populações; tampouco a sobrevida global. Esses dados nos sugerem que ainda há um longo caminho na compreensão do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin.

Esse achado está em concordância a estudos já publicados, nos quais o maior número de linfócitos CD 20 positivos no microambiente tumoral do LHc tem uma correlação significativa com uma sobrevida global mais longa e uma tendência a melhorar a sobrevida livre de progressão (GREAVES et al. 2013; TUDOR et al. 2013; PANICO et al. 2015).

O impacto favorável da expressão de CD20 pode indicar que as células B normais estão contribuindo para a resposta antitumoral ou representam precursores de células malignas que são mais responsivos ao tratamento (GREAVES et al. 2013). Outros estudos sugerem que há uma rede complexa de linfócitos B presentes no microambiente da LHc e que as células B podem contribuir ativamente tanto para uma resposta imune antitumoral local quanto ter um papel pró-tumoral. Isto indica que a rede de células B nos tumores é provavelmente tão heterogênea quanto o infiltrado de linfócitos T (TUDOR et al. 2013). Dados mais recentes indicam que os linfócitos CD 20 têm um papel ativo na determinação da evolução da doença, resultando em uma ação protetora e favorecendo um bom prognóstico, indicando que o microambiente rico em células B poderia exercer uma ação antitumoral efetiva. A perda desta ação protetora é refletida na progressão do tumor, estágio avançado e menor sobrevida. Poderia ainda ser consequência da progressão da doença que

destrói a arquitetura linfóide e determina uma redução da sobrevivência. A atividade antitumoral específica pode ser devida a resposta antineoplásica imune baseada na síntese de anticorpos específicos contra células neoplásicas, sobre a secreção de citocinas e quimiocinas (PANICO et al. 2015; VARDHANA e YOUNES 2016). Nesses estudos, embora demonstrado que a expressão de CD 20 pelas células do microambiente tumoral tem impacto positivo na sobrevida global, não é possível definir com segurança sobre quais mecanismos são responsáveis por esta resposta.

Ainda em relação a população de linfócitos, no nosso trabalho houve uma diferença estatisticamente significativa na expressão de células CD 3, CD 4 e CD 8 entre os dois centros, que foi maior nos pacientes do HHJ. Na análise univariada, esse achado foi importante para os pacientes do HHJ, que mostrou que um maior número de linfócitos T CD 3+ no microambiente está relacionada a maior SLE. Entretanto, na análise multivariada a população de células T não teve importância no desfecho. Vale ressaltar que não houve diferença significativa entre as duas populações estudadas em relação a sobrevida global e SLE.

Nossos achados confirmam que o papel dos linfócitos T do microambiente na patogênese do LHc permanece pouco compreendido. Em teoria, linfócitos T tem ação antitumoral, agindo para suprimir o desenvolvimento e crescimento de linfomas; o aumento da incidência de linfomas em pacientes que recebem imunossupressores de longo prazo e em camundongos imunodeficientes apoia essa hipótese (IMAI et al. 2000).

No LHc, geralmente, a maior população de células no microambiente são as células T. O infiltrado de células T é composto por CD8 + CTLs, CD4 + Th e CD4 + Tregs (VARDHANA e YOUNES 2016). As células HRS estão tipicamente em contato próximo e cercadas por células T CD4 +, em um padrão rosetiforme. As células T da roseta parecem ser compostas por células Th e Tregs (MA et al. 2008; ALDINUCCI et al. 2012). Foi demonstrado que as células T que estão agrupadas em padrão rosetiforme da roseta expressam o CD40L, uma característica das células Th2 e Tregs, e podem fornecer sinais de sobrevivência para as células HRS (CARBONE et al. 1995a e b).

A abundância de células T CD4 + em conexão direta com as células HRS pode ser benéfica para as células tumorais, simplesmente protegendo-as de um contato direto com células T CD8 + ou células NK. Além disso, os numerosos Tregs no microambiente do LHc também tem um importante papel funcional (MARSHALL et al. 2004). Essas células podem inibir as células citotóxicas pela secreção de IL-10, expressão de CTLA4 e, presumivelmente, vários outros mecanismos. O CTLA4 também é superegulado em células Th ativadas no microambiente HL, o que pode suprimir ainda mais um ataque de células anti-HRS por células citotóxicas (MARSHALL et al. 2004; MA et al. 2008; GREAVES et al. 2013).

Finalmente, a imunidade anti-tumoral prejudicada no LHc pode ser devido a uma incapacidade dos linfócitos T para reconhecer as células HRS. Nas células HRS frequentemente falta a expressão de MHC-I e MHC-II, que são necessários para o reconhecimento de antígenos por linfócitos T CD8 + e linfócitos T CD4 + (DIEPSTRA et al. 2007; STEIDL et al. 2011b). Enquanto os

linfócitos T no LHc se tornam incapazes de mediar a resposta antitumoral, outras evidências sugerem que eles podem realmente apoiar o crescimento e sobrevivência das células HRS. O LHc ocorre muitas vezes durante a resposta imune a infecções virais ativas, como mononucleose aguda mediada pelo vírus Epstein-Barr e durante a reconstituição imune após o início do tratamento terapia anti-retroviral em pacientes HIV +. Os linfócitos T podem promover a sobrevivência e proliferação de células HRS via ativação alternativa mediada por ligante CD40 / CD40 de NF-kB. Este sinal de crescimento pode ser particularmente importante para a sobrevivência das células RS, que perderam capacidade de ativar o NF-kB através receptores de sinais convencionais de linfócitos B (GRUSS et al. 1994; CARBONE et al. 1995a e b; GREAVES et al. 2013; LIU et al. 2014).

Um dado interessante nos achados de microambiente foi o aumento de linfócitos T CD 8 positivo nos casos de linfoma de Hodgkin relacionados ao EBV. Esse aumento foi visto nos casos de LHc relacionados ao EBV nas duas populações. Esse achado está em concordância com estudos que mostram que o ambiente tumoral do LHc associado ao EBV é rico em células CD8+ e microambiente do LHc (MASSINI et al. 2009).

Diversos estudos publicados mostram que o microambiente tumoral do LHc associado ao EBV apresenta alta densidade macrófagos com expressão de CD 68. Entretanto, no nosso trabalho não se confirmaram esses dados. Não houve diferença significativa entre a expressão de CD 68 nos pacientes com LHc associados ao EBV daqueles com LHc não associados ao EBV (KAMPER et al 2011, 2012).

No nosso estudo não houve associação estatisticamente significativa com o número de células CD 68 positivas e SLE, em discordância com diversos trabalhos publicados na literatura internacional que demonstram uma correlação entre o maior número de macrófagos no microambiente do LHc (TAM's) e um pior prognóstico para o paciente (KAMPER et al. 2011; STEIDL et al. 2011b; GREAVES et al. 2013).

Por outro lado, nossos dados estão alinhados com os dois estudos brasileiros publicados (AZAMBUJA et al. 2012; ASSIS et al. 2012), que também não demonstraram essa correlação. E com outros estudos publicados que não encontraram correlação entre o número de macrófagos associados ao tumor (TAM) com prognóstico (KAYAL et al. 2014; PING et al. 2014; AGUR et al. 2015).

Fatores que podem contribuir para esses achados divergentes são os diferentes métodos de pontuação, os pontos de corte que foram utilizados na medição de TAM, bem como a falta de consistência nos parâmetros utilizados dificulta a separação dos pacientes em populações de baixo e alto risco. (TZANKOV et al. 2010; KAMPER et al. 2011; AZAMBUJA et al. 2012; GREAVES et al. 2013). A pouca reprodutibilidade da imuno-histoquímica tem sido sugerida como uma razão para resultados inconclusivos, sendo necessários preditores com base no perfil de expressão gênica. Contudo, estes estudos de expressão gênica foram limitados por pequeno número de casos e a falta de dados clínicos disponíveis (STEIDL et al. 2010).

Desta forma, apesar dos diversos estudos indicam que TAM em LHc promovem crescimento tumoral e angiogênese, supressão das respostas

imunes adaptativas e contribuição para evasão por células tumorais e, portanto, pode estar associado um prognóstico mais reservado, a falta de convergência nos resultados publicados, dificulta a utilização do mesmo como um biomarcador (MURRAY e WYNN 2011; MANTOVANI et al. 2011; LAWRENCE e NATOLI 2011; ALLAVENA e MANTOVANI 2012).

8 CONCLUSÃO

- 1 As duas populações estudadas não apresentaram diferenças significativas entre subtipos histológicos, estádios da doença, distribuição por gênero, sobrevida global e sobrevida livre de eventos.
- 2 O status da infecção por EBV difere entre as duas populações, sendo significativamente maior na população na região Nordeste. Todavia, não influenciou sobrevida livre de eventos.
- 3 Os pacientes da região Nordeste tiveram maior expressão da subpopulação de linfócitos T que os pacientes da região Sudeste.
- 4 Os pacientes com linfoma de Hodgkin com positividade para EBV, em ambas as instituições, apresentaram um maior número de células expressando CD 8 no microambiente tumoral.
- 5 Para os pacientes da região Sudeste, os achados do microambiente não influenciaram a sobrevida livre de eventos. Para os pacientes da região Nordeste, um maior número de células expressando CD 20 favoreceu uma maior sobrevida livre de eventos.
- 6 Macrófagos associados ao tumor não mostraram associação com pior prognóstico, quando avaliados por CD68.

9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O estudo teve algumas limitações na coleta de dados. Na maioria dos prontuários pesquisados, não havia dados de IPS, VHS e LDH, dados que foram utilizados em alguns estudos de microambiente e que poderiam ter enriquecido a discussão. Nos pacientes do HHJ, quase 50% da amostra não realizou biópsia de medula óssea, impossibilitando a utilização desse dado para esta população.

A subpopulação de linfócitos T, a predominante no microambiente, foi pouco pesquisada. Fizemos marcadores apenas para a subpopulação de linfócitos Tregs. Possivelmente o estudo com mais marcadores de subpopulações T nos permitisse uma avaliação mais acurada do microambiente. Além disso, utilizamos apenas o marcador CD68 para avaliar a população de macrófagos, enquanto outros estudos utilizaram também o marcador CD163.

No projeto original, o microambiente iria ser avaliado através de análise digital pelo ImageScope®, que daria um número mais fidedigno dos linfócitos no microambiente. Entretanto, não foi possível realizar essa análise. Os TMAs foram escaneados e marcados, mas não havia disponibilidade de profissional qualificado para realizar a avaliação. Desta forma, foi realizada apenas uma estimativa visual de todos os marcadores. Embora realizada por dois patologistas, com intuito de diminuir os vieses de observação, a estimativa visual não é tão precisa quanto contagem de células.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams H, Obermann EC, Dirnhofer S, Tzankov A. Targetable molecular pathways in classical Hodgkin's lymphoma. **Expert Opin Investig Drugs** 2011; 20:141-51.

Agur A, Amir G, Paltiel O, et al. CD68 staining correlates with the size of residual mass but not with survival in classical Hodgkin lymphoma. **Leuk Lymphoma** 2015; 56:1315-9.

Aldinucci, Donatella et al. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. **J Pathol** 2010; 221:248-63.

Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, Colombatti A, Carbone A. The role of CD40/CD40L and interferon regulatory factor 4 in Hodgkin lymphoma microenvironment. **Leuk Lymphoma** 2012; 53:195-201.

Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. **Clin Exp Immunol** 2012; 167:195-205.

Arai S, Fanale M, DeVos S, et al. Defining a Hodgkin lymphoma population for novel therapeutics after relapse from autologous hematopoietic cell transplant. **Leuk Lymphoma** 2013; 54:2531-3.

Armstrong AA, Alexander FE, Cartwright R, et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: Further evidence for the three disease hypothesis. **Leukemia** 1998; 12:1272-6.

Assis MC, Campos AH, de Oliveira JS, et al. Regulatory T lymphocytes and tumor-associated macrophages have no impact on treatment response and survival in Brazilian patients with classical Hodgkin Lymphoma. **Blood** 2012; 120:4777. [Presented at 54th ASH Annual Meeting, December 08-11, 2012; Atlanta, Georgia].

Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's Lymphoma. **Ann Oncol** 2012; 23:736-42.

Banerjee D. Recent insights into the biology of Hodgkin's lymphoma. In: Rezaei N, editor. **Hodgkin's Lymphoma**. InTech; 2012. Available from: <URL:<https://bit.ly/2TZHVD>> [2019 jan 19]

Baumforth KRN, Birgersdotter A, Reynolds GM, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. **Am J Pathol** 2008; 173:195-204.

Biasoli I, Castro N, Delamain M, et al. Treatment outcomes for Hodgkin lymphoma: First report from the Brazilian Prospective Registry. **Hematol Oncol** 2018; 36:189-95.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J Pathol** 2002; 196:254-65.

Borchmann S, Müller H, Engert A. Hodgkin Lymphoma has a seasonal pattern of incidence and mortality that depends on latitude. **Sci Rep** 2017; 7:14903.

Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. **Int J Cancer** 2006; 118:1853-61.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Buccheri V, Perini GF, Penna AMD, Silveira TB, Bigni RS, Pimenta FCF. Hodgkin's lymphoma unmet medical needs in Brazil: experts' perspective. **J Bras Econ Saúde** 2018; 10:118-25.

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

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.

Carbone A, Gloghini A, Gruss HJ, Pinto A. CD40 ligand is constitutively expressed in a subset of T cell lymphomas and on the microenvironmental reactive T cells of follicular lymphomas and Hodgkin's disease. **Am J Pathol** 1995a; 147:912-22.

Carbone A, Gloghini A, Gruss HJ, Pinto A. CD40 antigen expression on Reed-Sternberg cells: a reliable diagnostic tool for Hodgkin's disease. **Am J Pathol** 1995b; 146:780-1.

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.

Carbone A, Gloghini A. Epstein Barr virus-associated Hodgkin lymphoma. **Cancers** (Basel) 2018; 10:163.

Cartwright RA, Watkins G. Epidemiology of Hodgkin's disease: a review. **Hematol Oncol** 2004; 22:11-26.

Clarke CA, Glaser SL. Epidemiologic trends in HIV-associated lymphomas. **Curr Opin Oncol** 2001; 13:354-9.

Chan JK. The New World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future. **Hematol Oncol** 2001; 19:129-50.

Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. **J Clin Oncol** 1999; 17:1244.

Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:579-86.

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.

Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. **Blood** 2009; 113:2765-3775.

Cohen J. Epstein-Barr virus infection. **N Engl J Med** 2000; 343:481-92.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell** 2006; 124:263-6.

da Silveira TB, Buccheri V, Perini GF, et al. Treatment patterns of Hodgkin's lymphoma in Brazil: experts' perspective. **J Bras Econ Saúde** 2018; 10:172-8.

de la Cruz-Merino L, Lejeune M, Nogales Fernández E, et al. Role of immune escape mechanisms in Hodgkin's lymphoma development and progression: a whole new world with therapeutic implications. **Clin Dev Immunol** 2012, 2012:756353.

Diehl V, Sextro M, Franklin J, et al. Clinical presentation, course, and prognostic factors in lymphocyte predominant Hodgkin's disease and lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease: report from the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte Predominant Hodgkin's Disease. **J Clin Oncol** 1999; 17:776-83.

Diepstra A, van Imhoff GW, Karim-Kos HE, et al. HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's Lymphoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:3101-8.

Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection. **Am J Clin Pathol** 2002; 118:25-30.

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

Feuerborn A, Möritz C, von Bonin F, et al. Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. **Leuk Lymphoma** 2006; 47:1932-40.

Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. **JAMA** 2001; 285:1736-45.

Fukuda M, Kawaguchi Y. Role of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif of latent membrane protein 2A (LMP2A) in Epstein-Barr Virus LMP2A-induced cell transformation. **J Virol** 2014; 88:5189-94.

Glaser S, Jarrett R. The epidemiology of Hodgkin's disease. **Baillière's Clin Haematol** 1996; 401-16.

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

Glaser S, Hsu J. Hodgkin's disease in Asians: incidence patterns and risk factors in population-based data. **Leuk Res** 2002; 26:261-9.

Goldin LR, McMaster ML, Ter-Minassian M, et al. A genome screen of families at high risk for Hodgkin lymphoma: evidence for a susceptibility gene on chromosome 4. **J Med Genet** 2005; 42:595-601.

Guerriero JL. Macrophages: the road less traveled, changing anticancer therapy. **Trends Mol Med** 2018; 24:472-89.

Guo B, Cen H, Tan X, Ke Q. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. **BMC Med** 2016; 14:159.

Greaves P, Clear A, Coutinho R, et al. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. **J Clin Oncol** 2013; 31:256-62.

Gruss HJ, Hirschstein D, Wright B, et al. Expression and function of CD40 on Hodgkin and Reed-Sternberg cells and the possible relevance for Hodgkin's disease. **Blood** 1994; 84:2305-14.

Hallack Neto AE, Mayrink GTC, Costa, LJ, dos Santos KB. Expression of Epstein-Barr Virus in Cell of Classical Hodgkin's Lymphoma Tumor. **Blood** 2016; 128:A5358. [Presented at ASH 2016-58th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Dec 3-6, 2016]

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. **J Clin Oncol** 1999; 17:3835-49.

Harris JA, Jain S, Ren Q, Zarineh A, Liu C, Ibrahim S. CD163 versus CD68 in tumor associated macrophages of classical Hodgkin lymphoma. **Diagn Pathol** 2012; 7:12. 34.

Hodgkin. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. **Med Chir Trans** 1832; 17:68-114.

Hsu JL, Glaser SL. Epstein-Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2000; 34:27-53.

Huh J. Epidemiologic overview of malignant lymphoma. **Korean J Hematol** 2012; 47:92-104.

Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. **Lancet** 2000; 356:1795-9.

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

Jaffe ES, Arber DA, Campo E, Harris NL. **Hematopathology**. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2016. Classifical Hodgkin's and related lesions; p.535-45.

Jiang T, Cheng X, Jia Y. Prognostic value of tumor-associated macrophages in classic Hodgkin's lymphoma: systematic review and meta-analysis. **Int J Clin Exp Med** 2016; 9:10784-92.

Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF- κ B Signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. **Blood** 2007; 109:2700-7.

Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honoré B, Nyengaard JR, D'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica** 2011; 96:269-76.

Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit SJ, Honore B, d'Amore F. Epstein-Barr Virus status correlates with composition and prognostic impact of the tumor microenvironment in classical Hodgkin lymphoma. **Blood** 2012; 120:52. [Presented at 54th ASH Annual Meeting, December 08-11, 2012; Atlanta, Georgia].

Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein-Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. **J Clin Pathol** 2007; 60:1342-9.

Kapp U, Dux A, Schell-Frederick E, et al. Disseminated growth of Hodgkin's-derived cell lines L540 and L540cy in immune-deficient SCID mice. **Ann Oncol** 1994; 5 suppl 1:S121-S6.

Kharazmi E, Fallah M, Pukkala E, Olsen JH, Tryggvadottir L, Sundquist K. Risk of familial classical Hodgkin lymphoma by relationship, histology, age, and sex: a joint study from five Nordic countries. **Blood** 2015; 126:1990-5.

Kayal S, Mathur S, Karak AK, et al. CD68 tumor-associated macrophage marker is not prognostic of clinical outcome in classical Hodgkin lymphoma. **Leuk Lymphoma** 2014; 55:1031-7.

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

Küppers R, Sousa AB, Baur AS, Strickler JG, Rajewsky K, Hansmann ML. Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. **Mol Med** 2001; 7:285-92.

Küppers R. New insights in the biology of Hodgkin lymphoma. **Hematol Am Soc Hematol Educ Program** 2012; 2012:328-34.

Lakhtakia R, Burney I. A historical tale of two Lymphomas: Part I: Hodgkin lymphoma. **Sultan Qaboos Univ Med J** 2015; 15:e202-6.

Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nat Rev Immunol** 2011; 11:750-61.

Leventaki V, Drakos E, Karanikou M, et al. C-JUN N-terminal kinase (JNK) is activated and contributes to tumor cell proliferation in classical Hodgkin lymphoma. **Hum Pathol** 2014; 45:565-72.

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.

Liu Y, Sattarzadeh A, Diepstra A, Visser L, van den Berg A. The microenvironment in classical Hodgkin lymphoma: an actively shaped and essential tumor component. **Semin Cancer Biol** 2014; 24:15-22.

Ma Y, Visser L, Blokzijl T, et al. The CD4₊CD26₊ T-cell population in classical Hodgkin's lymphoma displays a distinctive regulatory T-cell profile. **Lab Invest** 2008; 88:482-90.

Maggio EM, van den Berg A, de Jong D, Diepstra A, Poppema S. Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. **Am J Pathol** 2003; 162:29-35.

Mantovani A, Germano G, Marchesi F, Locatelli M, Biswas SK. Cancer-promoting tumor-associated macrophages: new vistas and open questions. **Eur J Immunol** 2011; 41:2522-5.

Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. **Blood** 2004; 103:1755-62.

Martín-Moreno AM, Roncador G, Maestre L, et al. CSF1R protein expression in reactive lymphoid tissues and lymphoma: its relevance in classical Hodgkin Lymphoma. **PLoS One** 2015; 10:e0125203.

Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin lymphoma. **Mediterr J Hematol Infect Dis** 2009; 1:e2009013.

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

Mozaheb Z. Epidemiology of Hodgkin's Lymphoma. **Health** 2013; 5:17-22.

Mueller N, Evans A, Harris NL, et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus: altered antibody pattern before diagnosis. **N Engl J Med** 1989; 320:689-95.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat Rev Immunol** 2011; 11:723-37.

Nakatsuka S, Aozasa K. Epidemiology and pathologic features of Hodgkin lymphoma. **Int J Hematol** 2006; 83:391-7.

Oza AM, Tonks S, Lim J, Fleetwood MA, Lister TA, Bodmer JG. A clinical and epidemiological study of human leukocyte antigen-DPB alleles in Hodgkin's disease. **Cancer Res** 1994; 54:5101-5.

Panico L, Tenneriello V, Ronconi F, et al. High CD20+ background cells predict a favorable outcome in classical Hodgkin lymphoma and antagonize CD68+ macrophages. **Leuk Lymphoma** 2015; 56:1636-42.

Ping LY, Ding N, Shi YF, et al. Clinical characteristics and prognosis analysis of patients with LMP-1 positive Hodgkin's lymphoma after EBV infection. **J Exp Hematol** 2014; 22:78-84.

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

Ree HJ, Kadin ME. Macrophage-histiocytes in Hodgkin's disease. The relation of peanut-agglutinin-binding macrophage-histiocytes to clinicopathologic presentation and course of disease. **Cancer** 1985; 56:333-8.

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

Sanchez-Espiridion B, Martin-Moreno AM, Montalban C, et al. Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica** 2012; 97:1080-4.

Santos FM, PrA.C.Camargo Cancer Centerhia LF, Linardi CGC, Buccheri V. Tratamento do linfoma de Hodgkin após falha do transplante autólogo. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2008; 30:266-27.

Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin Lymphoma. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:151-74.

Schwering I, Bräuninger A, Klein U, et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. **Blood** 2003; 101:1505-12.

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

Shenoy P, Maggioncalda A, Malik N, et al. Incidence patterns and outcomes for hodgkin lymphoma patients in the United States. **Adv Hematol** 2011; 2011:725219.

Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, et al. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: clinical presentation and treatment outcome in 100 patients treated within German Hodgkin's Study Group trials. **J Clin Oncol** 2005; 23:5739-45.

Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. **N Engl J Med** 2010; 362:875-85.

Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. **J Clin Oncol** 2011a; 29:1812-26.

Steidl C, Farinha P, Gascoyne RD. Macrophages predict treatment outcome in Hodgkin's lymphoma. **Haematologica** 2011b; 96:186-9.

Stein H, Pileri SA, Weiss LM, Poppema S, Gascoyne RD, Jaffe ES. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. IARC: Lyon; 2017. Hodgkin lymphomas: introduction; p.424-42. (World Health Organization Classification of Tumours – WHO)

Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. **Blood** 2001; 98:194-200.

Swerdlow AJ. Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. **Eur J Nucl Med Mol Imaging** 2003; 30 Suppl 1:S3-12.

Swerdlow S, Campo E, Harris NL, et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. 4th ed. Lyon: IARC; 2008. (WHO Classification of Tumours, Revised 4th ed. v. 2).

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood** 2016; 127:2375-90.

Tan KL, Scott DW, Hong F, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. **Blood** 2012; 120:3280-7.

Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J, Diehl V. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. **Ann Oncol** 2002; 13 Suppl 4:147-52.

Tudor CS, Distel LV, Eckhardt J, Hartmann A, Niedobitek G, Buettner M. B cells in classical Hodgkin lymphoma are important actors rather than bystanders in the local immune reaction. **Hum Pathol** 2013; 44:2475-86.

Tzankov A, Matter MS, Dirnhofer S. Refined prognostic role of CD68-positive tumor macrophages in the context of the cellular microenvironment of classical Hodgkin lymphoma. **Pathobiology** 2010; 77:301-8.

Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. **Haematologica** 2016; 101:794-802.

Vassallo J, Metze K, Traina F, De Souza CA, Lorand-Metze I. Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients. **Haematologica** 2001; 86:1227-8.

Vassallo J, Paes RP, Soares FA, et al. Histological classification of 1,025 cases of Hodgkin's lymphoma from the State of São Paulo, Brazil. **São Paulo Med J** 2005; 123:134-6.

Zaki MA, Wada N, Ikeda J, et al. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. **Virchows Arch** 2011; 459:361-6.

Anexo 1 - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do microambiente tumoral e da infecção pelo EBV no linfoma de Hodgkin nas regiões nordeste e sudeste do Brasil.

Pesquisador: JOSÉ VASSALLO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46607615.2.3001.5528

Instituição Proponente: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

Patrocinador Principal: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1:315.571

Apresentação do Projeto:

Título do projeto: ESTUDO DO MICROAMBIENTE TUMORAL E DA INFECÇÃO PELO EBV NO LINFOMA DE HODGKIN NAS REGIÕES NORDESTE E SUDESTE DO BRASIL.

Instituição Proponente: A. C. Camargo Cancer Center

Instituição colaboradora: Instituto do Câncer do Ceará

Pesquisadores envolvidos no projeto:

Orientador: José Vassallo

Aluna de doutorado (DINTER): Maria do Patrocínio Ferreira Grangeiro Beco

Aluno de mestrado: Leonardo Lordello de Melo

Trata-se de um estudo analítico, do tipo coorte retrospectivo. Os casos consistem em pacientes atendidos no ICC ou AC Camargo com diagnóstico de linfoma Hodgkin, com material de biópsia e prontuários presentes nas instituições de estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar retrospectivamente o perfil de infiltrado inflamatório associado ao tumor em amostras de origens distintas do país: Ceará e São Paulo, avaliando se possíveis diferenças estariam associadas

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.441-700
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@hospcancer-icc.org.br

Continuação do Parecer: 1.315.571

a fatores geográficos ou às características clinicopatológicas dos LH (gênero e idade do paciente, subtipo histológico, estágio e relação com o EBV). Adicionalmente, será avaliado o impacto prognóstico dos marcadores pesquisados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo é retrospectivo, sem contato com os pacientes, assim, não existe riscos para os mesmos. Entretanto, caso seja alterado diagnóstico anátomo-patológico após revisão das lâminas ou identificado algum fator prognóstico que possa influenciar no seguimento dos pacientes, este será informado e esclarecido sobre os achados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto pretende avaliar a interação entre o linfoma e seu microambiente, em busca de marcadores prognóstico no infiltrado inflamatório peritumoral com ênfase em resquisar possíveis diferenças regionais ou características clinicopatológicas distintas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente

Recomendações:

Sem pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado pelo CEP, sem quaisquer pendências, acompanhando o parecer relatado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_540915.pdf	29/06/2015 10:39:32		Aceito
Outros	FORMULÁRIO PARA SUBMISSÃO DO PROJETO DE PESQUISA AO CEP - Corrigido.pdf	29/06/2015 10:39:12		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_540915.pdf	29/06/2015 10:19:11		Aceito

Endereço: PAPI JUNIOR
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

Maurício Página 02 de 03

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.315.571

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO 540915.pdf	29/06/2015 08:14:10		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	29/06/2015 08:12:59		Aceito
Outros	Cronograma do projeto.pdf	28/06/2015 21:25:16		Aceito
Outros	Declaração de Ciência e comprometimento.pdf	28/06/2015 21:24:52		Aceito
Outros	Declaração ICC.pdf	28/06/2015 21:24:17		Aceito
Outros	Declaração infra estrutura patologia (1).pdf	28/06/2015 21:23:25		Aceito
Outros	Declaração sobre os dados coletados.pdf	28/06/2015 21:15:37		Aceito
Outros	Declaração sobre uso e destino do material biológico.pdf	28/06/2015 21:15:04		Aceito
Outros	Identificação dos currículos.pdf	28/06/2015 21:11:50		Aceito
Outros	Orçamento financeiro detalhado.pdf	28/06/2015 21:11:27		Aceito
Outros	Termo de compromisso do pesquisador.pdf	28/06/2015 21:10:47		Aceito
Outros	Termo de Dispensa.pdf	28/06/2015 21:10:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	LINFOMA DE HODGKIN E MICROAMBIENTE - Modificando.doc	28/06/2015 20:25:01		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 10 de Novembro de 2015

Assinado por:

Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

Apêndice 1 - Formulário de Coleta de Dados Clínicos

FICHA PACIENTES ESTUDO DE HODGKIN

Procedência dos dados: ICC () ACC ()

Nome: _____

Prontuário: _____ DN: _____ Sexo: _____

Naturalidade: _____ Procedência: _____

Estadiamento Ann Arbor:

Regiões acometidas:

Topografia da biópsia:

HE ICC _____ HE outro local: _____

Data:

IHQ ICC _____ IHQ outro local: _____

Data:

Status de MO:

AP de MO:

Tipo histológico clássico

() Esclerose nodular

() Celularidade mista

() Rico em linfócitos

() Depleção linfocitária

Tipo predominância linfocitária nodular: ()

Imunofenotipagem:

Data do diagnóstico histológico:

Resultados laboratoriais relevantes:

Hb: _____ Albumina: _____

Leucócitos Totais: _____ Linfócitos: _____

Monócitos: _____

EBV (IgG): _____ HIV: _____

IPS:

Protocolo utilizado

MOPP	ABVD	MOPP- ABV	CMOPP- ABV	EEVM - Mp - Etop
CMVA	ESHAP	DHAP	ILE	DEXA-BEAN

Data da QT1: _____ Regularidade do ciclo: _____

Data da RTX: _____ Dose da RTX: _____

Localização _____

Houve remissão: Sim () Não: ()

Se sim, completa ()

Houve recidiva: Sim Não: _____

Tratamento de resgate: _____

Protocolo da QT12 _____ Data da QT2: _____

TMO: _____ Data do TMO: _____

FOLLOW UP _____

Vivo em remissão completa	Vivo com doença	Morte pela doença
Morte por outra causa	Perda do follow up	2ª neoplasia

Data da última consulta: _____

Observações: _____