

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Thereza Christina Sampaio Lafayette

**Linfomas Não Hodgkin (LNH) associados ao vírus Epstein Barr (EBV) em
crianças transplantadas: caracterização de expressão viral e tratamento com o
emprego de anticorpos Anti CD20**

São Paulo

2015

Thereza Christina Sampaio Lafayette

**Linfomas Não Hodgkin (LNH) associados ao vírus Epstein Barr (EBV) em
crianças transplantadas: caracterização de expressão viral e tratamento com o
emprego de anticorpos Anti CD20**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Pediatria
Orientador: Vicente Odone Filho

São Paulo
2015

Dedicatória

Em memória de meu pai Paulo

À minha mãe Maria Thereza.

Aos meus irmãos: Nelson, Paulo e Lucia.

Às minhas filhas Paula e Julia.

Ao Waldir, meu marido.

Aos meus filhos de coração: Cláudia, Lawrence,
Maria Tereza e Walter.

Agradecimentos

Ao professor Vicente Odone Filho, pelo excepcional ideal científico, competência, habilidade e dedicação ao seu ofício de orientador.

À amiga de uma vida, Virgínia Maria Cóser, pela extraordinária disponibilidade, paciência e competência, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

À Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, pelo comprometimento e inestimável contribuição na execução da etapa laboratorial deste estudo.

Ao Gusmão, pelo valioso auxílio na pesquisa bibliográfica.

À Vânia Cóser, pela capacidade de organização e notável espírito de colaboração.

Aos colegas do Serviço de Hematologia e Oncologia Pediátrica, que me substituíram durante o período de afastamento do trabalho.

Às minhas incansáveis colaboradoras Santina, Célia e Margarete, pela compreensão até aqui.

À professora Roselaine Zanini, pela análise estatística dos dados.

À Dra. Lilian Maria Cristofani, pelo auxílio em momentos de dúvida e hesitação.

Resumo

Lafayette, TCS: Linfomas Não Hodgkin (LNH) associados ao vírus Epstein Barr (EBV) em crianças transplantadas: caracterização de expressão viral e tratamento com o emprego de anticorpos Anti CD20 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2015. 64 f.

A doença linfoproliferativa pós transplante (DLPT) é a proliferação tecidual secundária mais comum em crianças submetidas a transplante de órgãos sólidos, e representa um espectro de proliferação linfoide clínica e morfológicamente heterogêneo que vai desde uma hiperplasia policlonal indolente até linfomas agressivos. Aproximadamente 80% das DLPT estão associadas ao vírus Epstein Barr (EBV) e é originária de células B, entre 10 a 15% tem origem em células T e aproximadamente 1% em células *natural killer*. O status sorológico negativo para EBV pré transplante e o grau de imunossupressão são os fatores de risco de maior relevância para o desenvolvimento desta enfermidade. A apresentação clínica é diversa e sintomas constitucionais podem estar presentes simulando infecção e ou rejeição ao órgão transplantado. A confirmação do diagnóstico por exame histopatológico é, habitualmente, necessária e a hibridização *in situ* geralmente detecta as partículas de EBV nos tecidos examinados. A melhor opção terapêutica ainda não está definida e atualmente o tratamento consiste na redução da imunossupressão associada ao uso do anticorpo Anti CD20 e ou quimioterapia citotóxica além da terapia celular disponível em alguns centros. Este estudo teve por objetivos avaliar a resposta tumoral ao uso do anticorpo Anti CD20 na DLPT de células B EBV positivas pós transplante de órgãos sólidos, além de associar a neoplasia à eventual inclusão genômica de DNA/EBV na célula neoplásica. Foram analisados retrospectivamente os prontuários de vinte e três pacientes com até 18 anos incompletos admitidos na Unidade de Internação do Serviço de Onco-Hematologia do Instituto da Criança (ICR) e Instituto do Tratamento do Câncer Infantil (ITACI) que desenvolveram DLPT CD20 positiva pós transplante de órgãos sólidos comprovada histologicamente entre 8 de março de 1995 e 13 de agosto de 2011. Todos foram submetidos à redução da imunossupressão, treze receberam Anti CD20 isolado, três Anti CD20 associado à quimioterapia citotóxica e sete pacientes não fizeram uso desta droga. A sobrevida global em dois anos dos pacientes que receberam Anti CD20 foi de 81,45% e quando comparada à sobrevida global de 37,5% dos que não receberam a droga revelou diferença estatística significativa ($p=0,02$). Todos os pacientes tiveram a detecção da proteína de latência viral de EBV *Latent Membrane Protein1* (LMP1) na célula tumoral através da técnica de hibridização *in situ* realizada em blocos de parafina devidamente armazenados ao diagnóstico. A curta duração do tratamento com o Anti CD20, a toxicidade aceitável em relação às demais alternativas terapêuticas, a possibilidade de seu uso exclusivo, sua eficácia inclusive na doença de histologia agressiva e associação às

demais alternativas de tratamento na doença refratária sugerem a inclusão desta droga no arsenal terapêutico atualmente disponível.

Palavras chave: Doença linfoproliferativa pós transplante (DLPT), Epstein Barr Vírus (EBV), Anti CD20

Abstract

Lafayette, TCS: Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) associated to Epstein Barr virus (EBV) in children who underwent organ transplantation: characterization of the viral expression and treatment with Anti-CD20 antibodies.

Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) is the most common secondary tissue proliferation that occurs in children after solid organ transplantation and represents a spectrum of clinical lymphoid proliferation and morphologic heterogeneity that goes from an indolent polyclonal hyperplasia to aggressive lymphomas. Approximately 80% of PTLD is associated with Epstein Barr virus (EBV) and is of B-cell origin, 10 to 15% of T-cells and approximately 1% of natural killer cells. *EBV* pretransplant seronegativity and the degree of immunosuppression are the most relevant risk factors for developing the disease. Clinical presentation is diverse and constitutional symptoms may simulate infection and/or organ transplanted rejection. Histopathologic examination is usually necessary to confirm diagnosis and, generally, *in situ* hybridization detects the EBV particles in examined tissues. The best treatment option is yet to be determined and the current treatment consists of immunosuppression reduction associated with the use of anti CD20 antibody and/or cytotoxic chemotherapy besides cell therapy only available in some centers. This study aimed to evaluate tumor response to the use of anti CD20 antibody in positive B-cell EBV PTLD after solid organ transplantation and the association of the neoplasia to the eventual inclusion of genomic EBV/DNA in the tumor cell. We retrospectively analyzed medical records of twenty-three patients under 18 years of age who were admitted to the inpatient unit of Serviço de Onco-Hematologia do Instituto da Criança (ICR) e Instituto do Tratamento do Câncer Infantil (ITACI) who developed histologically proven CD20 positive pediatric *PTLD* after solid organ transplantation between 8 March 1995 and 13 August 2011. All patients were submitted to immunosuppression reduction, thirteen received isolated Anti CD20, three Anti CD20 associated with cytotoxic chemotherapy and seven patients did not use this drug. The estimated 2-year overall survival rates of patients who received anti CD20 was 81.45% and when compared to the overall survival rates of those who did not receive the drug it was 37, 5%, showing a statistically significant difference ($p = 0.02$). All patients had the Epstein-Barr virus latency protein

(latent membrane protein1 - LMP1) detected in tumor paraffin embedded stored at diagnosis by the *in situ* hybridization technic. The short duration of the Anti CD20 treatment, its acceptable toxicity compared to other therapeutic alternatives, the possibility of its exclusive use, its effectiveness in aggressive histology disease and the association with other treatment alternatives in refractory disease, suggest this drug inclusion to the currently available therapeutic arsenal.

Keywords: Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD), Epstein–Barr virus (EBV), Anti CD20.

Lista de Figuras

Figura 1 – Anti CD20 – Três potenciais mecanismos de ação: Apoptose, ativação do complemento e citotoxicidade celular anticorpo dependente	30
Figura 2– Sobrevida Global dos pacientes estudados	49
Figura 3 – Sobrevida Global dos pacientes com apresentação tardia ou precoce.....	49
Figura 4 – Sobrevida Global dos pacientes estudados com doença monomórfica e polimórfica.....	50
Figura 5 – Sobrevida Global dos pacientes que receberam ou não Anti CD20.....	50
Figura 6 – Sobrevida Global dos pacientes que fizeram uso exclusivo de Anti CD20	51
Figura 7– Sobrevida Global dos pacientes com doença monomórfica que usaram ou não Anti CD20.....	51
Figura 8– Sobrevida Global dos pacientes com doença tardia ou precoce que receberam Anti CD20.....	52
Figura 9 – Sobrevida livre de eventos dos pacientes estudados.....	53
Figura 10 – Sobrevida livre de eventos dos pacientes com apresentação tardia ou precoce	53
Figura 11 – Sobrevida livre de eventos dos pacientes que receberam ou não Anti CD20.....	54
Figura 12 – Sobrevida livre de eventos dos pacientes com doença monomórfica e polimórfica.....	54
Figura 13 – Sobrevida livre de eventos dos pacientes que receberam ou não Anti CD20.....	55
Figura 14 – Sobrevida Livre de eventos dos pacientes que fizeram uso exclusivo de Anti CD20	55

Lista de Abreviaturas

- ANTI CD20 – Anticorpo anti CD20
- ARA C – Aracytin
- AZT – Azatioprina
- BCL6 – *B Cell Lymphoma 6 Gene*
- CE – Corticosteróide
- CMV – Citomegalovírus
- C-MYC – *cellular gene myelocytomatosis*
- CTH – Células Tronco Hematopoiéticas
- CV-EBV – Carga viral do vírus Epstein Barr
- DECH – Doença do enxerto contra hospedeiro
- DLPT – Doença Linfoproliferativa pós Transplante
- EBER – Epstein Barr Early RNAs
- EBNA - *Epstein Barr nuclear antigen*
- EBV – *Epstein Barr Virus*
- FISH – *Fluorescent in situ Hybridization*
- FK506 – Tacrolimus
- HLA- B – human leukocyte antigen B
- HLA-DR – human leukocyte antigen DR
- IgIV – Imunoglobulina intravenosa
- IRC – Insuficiência Renal Crônica
- IS – Imunossupressão
- ITACI – Instituto do Tratamento do Câncer Infantil
- LB – Linfoma de Burkitt
- LBDGC – Linfoma B difuso de grandes células

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LMP1 – *Latent Membrane Protein1*

LNH – Linfoma Não Hodgkin

MALT – *Mucosa-associated lymphoid tissue*

MMF – Micofenolato mofetil

MO – medula óssea

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

PET-CT – *Positron emission tomography – computer tomography*

QTC – Quimioterapia Citotóxica

RI – Redução da Imunossupressão

SG – Sobrevida Global

SLE – Sobrevida Livre de Eventos

SN – Síndrome Nefrótica

SNC – Sistema Nervoso Central

TGF- β – Fator de crescimento tumoral

TK – Thimidina Kinase

TOS – Transplante de órgão sólido

VM-26 – Teniposide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Incidência e fatores de risco.....	16
1.2	Aspectos clínicos	18
1.3	Fisiopatologia.....	19
1.4	Diagnóstico	20
1.4.1	Histopatologia	21
1.4.1.1	Lesões precoces	21
1.4.2	Carga Viral de EBV e Monitorização	24
1.5	Histórico.....	26
1.6	Tratamento	26
1.6.1	Redução da imunossupressão	27
1.6.2	Quimioterapia Citotóxica	28
1.6.3	Anticorpos Monoclonais	28
1.6.4	Cirurgia e Radioterapia	31
1.6.5	Antivirais.....	32
1.6.6	Imunoterapia	33
2	OBJETIVOS	36
3	MÉTODOS	37
3.1	Casuística	37
3.1.2	Critérios de Inclusão.....	38
3.2	Diagnóstico de DLPT	38
3.2.1	Anatomopatologia	38

3.2.2	Detecção do genoma de EBV	38
3.3	Tratamento	39
3.4	Análise Estatística	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	DLPT em Transplante Cardíaco	45
4.2	DLPT em Transplante Hepático.....	45
4.3	DLPT em Transplante Renal	46
4.4	DLPT em Transplante de Medula Óssea.....	47
4.5	Uso do Anti CD20	47
4.6	Carga Viral de EBV.....	48
4.7	Sobrevida Global (SG).....	49
4.8	Sobrevida Livre de Eventos (SLE).....	52
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Os pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos (TOS) têm um risco 5 a 10 vezes maior que a população em geral de desenvolver uma neoplasia e o risco cumulativo aumenta para mais de 50% após 20 anos do transplante ⁽¹⁾. Exemplificando, os carcinomas de lábio e pele são os mais comuns após transplante renal em adultos, seguidos das doenças linfoproliferativas ⁽²⁾. A estimulação antigênica induzida pelo enxerto, a imunossupressão crônica e seu efeito oncogênico associados a infecções pelo vírus Epstein Barr (EBV) tem sido propostos como hipóteses prováveis para o desenvolvimento da Doença Linfoproliferativa Pós Transplante (DLPT). São as neoplasias mais comuns em crianças submetidas a TOS e representam, efetivamente, um espectro de proliferação linfoide clínica e morfológicamente heterogêneo que vai desde uma hiperplasia policlonal indolente até linfomas agressivos, mostrando lesões localizadas ou difusas, frequentemente extra nodais e no órgão transplantado e, menos comumente, doença disseminada rapidamente progressiva e de evolução fatal. Vem se tornando cada vez mais clinicamente relevantes em consequência aos avanços na área de transplantes, concomitantes ao desenvolvimento de imunossupressores progressivamente mais potentes ⁽³⁾, e seu uso gradativamente mais profuso.

Aproximadamente 80% das DLPT estão associadas ao EBV e são originárias de células B. Entre 10 a 15% têm origem em células T e aproximadamente 1% em células *natural killer* (NK). A incidência em crianças varia, conforme o órgão transplantado e consequente grau de imunossupressão, entre 1 a 20%. O estado sorológico EBV negativo pré transplante, comum nesta faixa etária, coloca esta população em maior risco que os adultos para o desenvolvimento desta complicação.

A doença pode se manifestar em qualquer período pós-transplante, desde o primeiro mês a vários anos após. Todavia, a maior parte dos casos é observada no primeiro ano após transplante e representa uma significativa causa de morbidade e mortalidade associadas ao procedimento.

1.1 Incidência e fatores de risco

Entre 1950 e 1970 os imunossupressores mais utilizados eram a azatioprina e a prednisona e neste período os casos de DLPT eram esporádicos o que, sem dúvida, pode ser atribuído a ainda muito limitada sobrevida pós-transplante. A partir da introdução da ciclosporina A em 1983 houve melhora significativa da “sobrevida do enxerto”, mas, em consequência, foi observado um aumento na incidência de DLPT. Exemplificando, em transplantes renais pediátricos o aumento foi de menos de 1 a 2,2% para 6% entre 1990 e 2000. Essa elevação do número de casos foi paralela ao advento da imunossupressão individualmente mais potente e a regimes de associação mais intensos, frequentemente incorporando um anticorpo anti-linfócito T (OKT₃ e timoglobulina) a três drogas imunossupressoras na manutenção ⁽⁴⁾.

Com relação aos imunossupressores utilizados atualmente, publicações mais antigas sugerem uma maior incidência de DLPT com o uso do Tacrolimus (FK506) quando comparado a ciclosporina, porém o aumento de experiência no manuseio desta droga e a redução dos níveis séricos alvo de 10 a 15 ng/ml para 5 a 10 ng/ml em estudos recentes, não demonstrou risco aumentado adicional com o uso deste fármaco. O micofenolato mofetil (MMF), usado concomitantemente a outros imunossupressores, principalmente ao tacrolimus, parece estar associado a risco reduzido de DLPT ⁽⁵⁾. Os inibidores mTOR (mammalian target of rapamycin) como o sirolimus e o everolimus tem demonstrado propriedades antiproliferativas em modelos de tumores linfoides, inclusive de DLPT de células B, e o tencirolimus tem demonstrado atividade clínica em pacientes imunocompetentes com linfoma B recidivado ou refratário. Se estas drogas são eficazes na presença de DLPT ou se deverão ser utilizadas após o diagnóstico de DLPT deverá ser motivo de estudos futuros ⁽⁶⁾.

Não há consenso em relação ao risco específico de cada um dos imunossupressores e a intensidade e a duração da imunossupressão (IS), muito mais do que uma droga em particular, parecem ser os fatores de maior relevância para o desenvolvimento da DLPT ⁽⁷⁾.

Sintetizando, a prevalência de DLPT associada ao EBV em transplante de órgãos sólidos varia entre 1 a 20% dependendo do tipo de órgão transplantado, status sorológico de EBV pré-transplante e idade do paciente. A DLPT EBV positiva, tipicamente se apresenta precocemente após o transplante com a maior incidência no primeiro ano após o mesmo, embora também possa ocorrer mais tardiamente. Em TOS o tempo mediano de aparecimento é em torno de 6 meses ⁽⁸⁾.

A infecção primária por EBV é o maior fator de risco para o desenvolvimento de doença sintomática incluindo DLPT e os pacientes pediátricos submetidos a TOS são significativamente mais suscetíveis ao desenvolvimento desta complicação, uma vez que a chance de serem sorologicamente negativos é maior que a da população adulta ⁽⁹⁾. O receptor EBV negativo apresenta um risco aproximado de 25% de desenvolver DLPT ⁽¹⁰⁾.

A variação das taxas de DLPT observada entre os transplantes dos diversos órgãos reflete os diferentes graus de imunossupressão necessários à proteção do enxerto, embora outros fatores como a quantidade de tecido linfático no órgão transplantado também contribuam ⁽¹¹⁾. A maior ocorrência de DLPT se observa nos transplantes de intestino (\cong 20%) e pulmões (\cong 15%) seguidos de fígado (5 a 10%), coração (\cong 6%) e rins (2 a 3%) ⁽¹²⁾. Em transplante de células tronco hematopoiéticas (CTH) a incidência é de 1% e o tempo mediano do início dos sintomas é de 2 meses após o procedimento. O risco é maior, de até 25%, nos transplantes não relacionados compatíveis, nos parcialmente compatíveis e com depleção de células T ⁽¹³⁾, refletindo o quanto a agressividade da intervenção sobre a condição imunológica normal é relevante para o desenvolvimento desta enfermidade.

A concomitância de outras doenças infecciosas virais, tais como a citomegalovirose, mormente se o doador for positivo para citomegalovírus (CMV) e o receptor negativo, e a hepatite C, têm participação na patogênese da DPLT, embora em menor escala ⁽¹⁴⁾, bem como a incompatibilidade HLA-B ou HLA-DR em que, independentemente da IS, o risco é proporcional ao grau de incompatibilidade ⁽¹⁵⁾.

Polimorfismos de citocinas anti-inflamatórias como a Interleucina 10 (IL10) e o fator de crescimento tumoral β (TGF- β) estão associados a maior suscetibilidade ao

desenvolvimento de DLPT / EBV positiva, sugerindo que desvios nas respostas pró e anti-inflamatórias estão envolvidos na patogênese desta doença ⁽¹⁶⁾.

A mortalidade é elevada e referida em até 48% em transplante renal, 44% nos hepáticos, 25% nos cardíacos e 36% nos intratorácicos: coração/pulmão e pulmão isoladamente ⁽¹⁷⁾. Em crianças, a estimativa atual de sobrevida, em um ano após o diagnóstico de DLPT, situa-se entre 56 a 73%, e de 40 a 61 % em 5 anos ⁽⁴⁾. A doença disseminada acompanhada de sintomas sistêmicos oferece o maior risco de mortalidade.

1.2 Aspectos clínicos

A apresentação clínica da DLPT é diversa e está relacionada ao nível de imunossupressão, a resposta imune e idade do receptor, a histopatologia e ao tempo decorrido desde o transplante. Sintomas constitucionais tais como febre, astenia, perda de peso, sudorese, linfadenopatias palpáveis, síndrome semelhante à mononucleose e sintomas relacionados à disfunção do órgão comprometido podem ser inicialmente observados.

Os sinais e sintomas da infecção por EBV e da DLPT, em particular, são mais exuberantes quando a infecção primária ocorre no período pós-transplante em pacientes sorologicamente negativos para o EBV, especialmente se o doador for EBV positivo. Verificou-se que 4% das crianças submetidas a TOS e 10% daquelas com infecção primária por EBV desenvolveram DLPT entre 1 mês e 5 anos após o procedimento; nas que faziam uso de ciclosporina como imunossupressor, 75% dos casos ocorreu durante o primeiro ano ⁽⁴⁾. A ocorrência cumulativa pode alcançar 12 a 20% em 7 a 12 anos após transplante hepático. Os sintomas virais, a mononucleose e a DLPT polimórfica tendem a ocorrer mais frequentemente no primeiro ano após o transplante enquanto que a doença monomórfica e linfoma ocorrem mais tardiamente.

O órgão transplantado é uma das localizações preferenciais da DLPT e o exato mecanismo deste comprometimento não está claramente elucidado; a estimulação antigênica crônica, a passagem de linfócitos com o enxerto ou o

desenvolvimento de linfoma proveniente de linfócitos do doador tem sido mencionados. O maior registro europeu, de aproximadamente 200.000 TOS estima que o enxerto esteja envolvido em 10,3% dos transplantes renais, 16% dos cardíacos, 21,8% dos hepáticos e 42,7% dos de coração-pulmão ⁽¹⁸⁾. Outros sítios envolvidos são o trato gastrointestinal (64%), linfonodos e sistema nervoso central (SNC) (6%). Pacientes pediátricos com DLPT abdominal podem apresentar hepatoesplenomegalia ou outras visceromegalias, usualmente associados à anemia (100%), sangramento intestinal (100%), emagrecimento (89%), hipoalbuminemia (89%), anorexia (78%), diarreia crônica (67%) e dor abdominal (44%) ⁽¹⁹⁾. O comprometimento das tonsilas e da pele é raro em adultos enquanto que nas crianças, juntamente com os linfonodos do anel de Waldeyer, estão muito frequentemente envolvidas. Locais pobres em tecido linfático, como por exemplo a língua, podem estar comprometidos sem aumento da carga viral, devendo portanto ser cuidadosamente monitorados ⁽²⁰⁾. Independentemente do tipo de enxerto, pacientes com doença localizada em linfonodos tem um prognóstico significativamente melhor do que aqueles com doença disseminada.

Os sinais e sintomas da DLPT podem simular infecção e ou rejeição ao órgão transplantado e em transplante de medula óssea o comprometimento sistêmico é a regra, podendo sugerir doença do enxerto contra hospedeiro (DECH). Por vezes, a única manifestação de envolvimento medular pode ser citopenia isolada sem causa aparente ⁽²¹⁾.

1.3 Fisiopatologia

O EBV é um “gama herpes vírus” de DNA que demonstra tropismo *in vivo* por células linfoides e epiteliais. A infecção pelo EBV é comum, 50% das crianças é soropositiva aos 5 anos de idade e 90% dos indivíduos geralmente o são na idade adulta. Tipicamente, ocorre infecção primária assintomática na infância, seguida de infecção persistente (latente) caracterizada por expressão viral restrita que, sob determinadas condições, pode modificar para a forma replicativa gerando a produção e liberação de novos vírions infectantes ⁽²²⁾. O EBV tem a habilidade de transformar e imortalizar os linfócitos B, que por este motivo adquirem a capacidade

de proliferação descontrolada ⁽²³⁾. Após a infecção lítica primária, o genoma viral é integrado ao linfócito B latente, promovendo o aparecimento de linfoblastos, nos quais o genoma viral é integrado sob a forma de episoma, alguns destes linfoblastos diferenciando-se em células B de memória, o que mantém a infecção permanente no hospedeiro ⁽²⁴⁾. Em receptores de transplantes, os imunossuppressores limitam as funções imunes incluindo a atividade da célula T citotóxica, contribuindo assim para a linfoproliferação desenfreada ^(25, 26).

O EBV é o agente causador da mononucleose infecciosa e está também reconhecidamente implicado na patogênese das neoplasias primárias linfoides e epiteliais. Está fortemente associado ao linfoma de Burkitt, bem como ao carcinoma indiferenciado de nasofaringe. Mais recentemente, tem sido vinculado ao Linfoma de Hodgkin, linfomas T periféricos, carcinoma indiferenciado de glândula salivar e alguns carcinomas gástricos. É considerado o fator causal mais importante na patogênese da DLPT, podendo ser detectado em até 90% das células linfomatosas dos pacientes acometidos ⁽²⁷⁾.

1.4 Diagnóstico

A DLPT frequentemente se apresenta com sintomas inespecíficos. A história clínica e o exame físico acompanhados de exames de imagem, tais como tomografia computadorizada e/ou endoscopia, eventualmente necessárias, são fundamentais para o diagnóstico imediato. O *Positron emission tomography – computed tomography* (PET-CT) se mostrou superior aos métodos convencionais de visualização. De qualquer forma, o diagnóstico final deverá sempre ser baseado no exame histopatológico.

A avaliação e monitorização da carga viral de EBV é necessária para a identificação precoce dos pacientes de alto risco. A CV-EBV aumentada, isoladamente, não é preditiva de DLPT, uma vez que pode significar uma resposta celular imune específica ao EBV. Os níveis limítrofes da carga viral de EBV (CV-EBV) não estão bem estabelecidos e a monitorização seriada demonstrando a dinâmica da elevação do número de cópias de DNA-EBV é uma abordagem útil para orientar a redução da IS e/ou a utilização de terapia celular com ou sem o Rituximab.

A Imunoistoquímica e métodos moleculares, incluindo a hibridização *in situ* nos tecidos examinados, detectam as partículas de EBV; já os anticorpos anti membrana-EBV latente (LMP1) e EBNA 2 podem ser pesquisados em blocos de parafina ou em tecido tumoral congelado.

1.4.1 Histopatologia

Em 2008 a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou a classificação atualizada da DLPT, que foi dividida em quatro categorias baseadas em critérios morfológicos, imunofenotípicos e genético moleculares ⁽²⁸⁾ (**Tabela 1**).

1.4.1.1 Lesões precoces

Incluem a hiperplasia plasmocítica (HP) e DLPT semelhante à mononucleose infecciosa. Ocorrem precocemente em relação ao transplante ⁽²⁹⁾. Na HP a arquitetura do linfonodo está preservada enquanto que numerosos plasmócitos e imunoblastos (que são na maioria EBV positivos) estão presentes na região interfolicular. Na DLPT semelhante à mononucleose infecciosa, a arquitetura do linfonodo está parcialmente preservada, ocorre expansão paracortical por numerosos imunoblastos, muitos dos quais transformados pelo EBV, entremeados por células T e plasmócitos; alguns exibem população clonal ou oligoclonal reduzida. A atipia celular é mínima. O genoma viral é tipicamente policlonal, ocasionalmente monoclonal ⁽⁷⁾.

1.4.1.2 DLPT Polimórfica

As lesões polimórficas mostram apagamento da arquitetura nodal ou uma lesão destrutiva extranodal; são compostas por uma variada população de células, desde linfócitos pequenos ou médios a plasmócitos e imunoblastos. A atipia celular é variável, com imunoblastos atípicos e células semelhantes às de Reed-Sternberg ⁽⁷⁾. Necrose, alto índice de mitoses e EBV são identificados na maior parte das

lesões. É a forma mais frequente em crianças e é tipicamente relacionada à infecção primária por EBV. São frequentemente monoclonais e uma pequena proporção (15%) revela anormalidades citogenéticas clonais⁽³⁰⁾.

1.4.1.3 DLPT Monomórfica

É subdividida em neoplasias de células B e células T baseada na classificação atual dos linfomas não Hodgkin pela OMS. Linfomas indolentes como o Linfoma Folicular e linfoma MALT (*Mucosa-associated lymphoid tissue*) são excluídos da classificação da DLPT. A DLPT de células B é a forma mais frequentemente encontrada, é classificada em linfoma B difuso de grandes células (LBDGC), linfoma de Burkitt, Mieloma de células plasmáticas, lesões semelhantes ao Plasmacitoma e outras neoplasias de células T/NK, incluindo linfoma T periférico (NOS), linfoma hepatoesplênico e outros. Lesões monomórficas são compostas de uma população uniforme de células neoplásicas. A maioria das DLPT-B monomórficas tem genoma de EBV e rearranjo de genes de imunoglobulinas. Djokic et. al., (2006) demonstraram que 72% destas lesões apresentam anormalidades citogenéticas incluindo trissomia do 9 e do 11 ou ambas, perda do 17p e rearranjo 8q24.1 (*C-MYC*)⁽³⁰⁾. As DLPT de células T usualmente contem rearranjos clonais de receptores de células T.

1.4.1.4 Linfoma de Hodgkin

É uma forma rara de DLPT com achados histológicos semelhantes ao Linfoma de Hodgkin clássico em imunocompetentes. O subtipo mais comum é a celularidade mista; as células de Hodgkin exibem o fenótipo clássico CD15+, CD30+, PAX5+, CD3- e CD45- e praticamente todas são EBV positivas. Algumas podem ser CD15 negativas, mas é necessário cautela em firmar o diagnóstico nesta eventualidade.

1.4.1.5 DLPT EBV negativa

A DLPT EBV negativa (de células B, células T, linfoma de Hodgkin e Mieloma plasmático) tende a ocorrer tardiamente em relação ao transplante e é pouco responsiva a redução da IS, sendo necessário o uso de quimioterapia convencional; as remissões são raras e as recidivas frequentes. A DLPT – L. Hodgkin constitui uma exceção e embora a toxicidade seja elevada e as respostas menos frequentes quando comparada aos imunocompetentes, a quimioterapia convencional é uma alternativa para a cura destes pacientes ⁽¹⁾.

Tabela 1 – Classificação DLPT - OMS (2008)

Categoria	Morfologia	Clonalidade
Lesões precoces <ul style="list-style-type: none"> • Hiperplasia plasmocítica • Lesões semelhantes à mononucleos e infecciosa 	Arquitetura intacta, linfócitos B pequenos policlonais mesclados com imunoblastos T e células plasmáticas tipicamente EBV+	Rara, pequena população clonal ou oligoclonal pode estar presente
DLPT polimórfica	Arquitetura não preservada, maturação linfoide (imunoblastos, células plasmáticas, linfócitos T; frequentemente EBV+)	Genes de Ig clonal tipicamente encontrados e células T não clonais
DLPT monomórfica Neoplasia de células B DLBCL Linfoma de Burkitt Mieloma de células plasmáticas Lesões semelhantes a plasmacitomas Outros Neoplasia de células T Linfoma T periférico (NOS)	Arquitetura não preservada preenche os critérios da OMS para neoplasia de células plasmáticas ou LNH (exceto os indolentes), fenótipo dependente do subtipo de LNH; EBV+ variável	Células B clonais e/ou T clonais presentes virtualmente em todos os casos.

– Adaptado de Gross, 2010 ⁽¹⁾

A biópsia de todos os locais de comprometimento é idealmente necessária uma vez que, em se tratando de moléstia de amplo espectro de apresentação, a concomitância de diferentes formas de DLPT pode estar presente.

1.4.2 Carga Viral de EBV e Monitorização

A carga viral de EBV é definida como o número de cópias de genomas de EBV nas células mononucleares do sangue periférico e o método mais frequentemente utilizado para aferi-la é o da reação em cadeia da polimerase (PCR) ⁽³¹⁾.

A monitorização de rotina da CV-EBV é uma ferramenta valiosa na detecção da infecção por EBV e na estimativa do risco de desenvolver DLPT, possibilitando a redução precoce da imunossupressão e a escolha de medidas terapêuticas apropriadas.

A monitorização seriada da CV-EBV por PCR, desenvolvida e utilizada em alguns serviços desde 1997, visa detectar a elevação progressiva da carga viral e consiste no método mais acurado para adaptar o tratamento a seguir. Deve ser preferencialmente em sangue total, uma vez que a maior parte do EBV DNA está confinado às células circulantes ⁽³²⁾.

A aferição da CV-EBV é influenciada pelo status sorológico no momento do transplante. É mais elevada nos pacientes com DLPT que desenvolveram a infecção primária por EBV após o transplante, quando comparados aos soropositivos pré-transplante, nos quais cargas virais mais baixas são frequentemente detectadas. Os pacientes pediátricos, na maioria, soronegativos pré transplante, frequentemente apresentam carga viral alta. Entretanto, as observações aferidas de carga viral elevada em pacientes assintomáticos, na infecção primária sem DLPT e na recuperação da DLPT, limitam a especificidade deste exame.

A carga viral de EBV cronicamente elevada, pós-transplante cardíaco, não é uma condição benigna e prenuncia o desenvolvimento de DLPT tardia *de novo* ou recorrente, frequentemente de histologia agressiva, incluindo linfomas. Assim sendo,

estes pacientes devem permanecer sob estreita vigilância com um alto índice de suspeição ⁽³³⁾. Estes achados não devem ser interpretados de maneira uniforme, uma vez que no universo dos transplantes hepáticos a CV-EBV persistentemente elevada não revelou a mesma tendência, bem como no transplante intestinal, provavelmente devido aos diferentes graus de imunossupressão necessários nestas três condições ⁽³⁴⁾. Estes achados confirmam o baixo valor preditivo positivo da CV-EBV cronicamente elevada e sugerem a participação de outros fatores na patogênese da DLPT pós TOS ⁽³⁵⁾. O estudo de alterações moleculares tais como o rearranjo de oncogenes ou o acúmulo de mutações em supressores de tumor além de outras anormalidades cromossômicas associados a CV-EBV, poderão contribuir na avaliação de risco de desenvolver DLPT após TOS, permitindo orientar a intervenção terapêutica a ser aplicada, exclusivamente nos pacientes de alto risco, preservando assim aqueles de baixo risco, embora com CV-EBV elevada.

Por outro lado, o valor preditivo negativo da CV-EBV persistentemente negativa foi de 100% no estudo de Green e colaboradores (2000), em transplante intestinal. Nenhum paciente que manteve carga viral de EBV menor ou igual a 40 cópias de genoma/ 10^5 linfócitos sangue periférico durante 6 meses desenvolveu DLPT, possibilitando inclusive a redução da frequência da monitorização ⁽³⁶⁾.

Nos estudos de DLPT a mensuração da CV-EBV tem sido realizada em linfócitos no sangue periférico ou no plasma, por métodos variados de PCR, com unidades e limites de positividade diversos. A amplificação do genoma de EBV tem utilizado uma ampla variedade de *primers* e genes alvo. Os resultados da detecção são apresentados por micrograma de DNA, cópias de genoma/ml de DNA e cópias de genoma/ 10^5 linfócitos periféricos. As definições de CV-EBV elevada, alta ou positiva são arbitrariamente estabelecidas e variam entre os diferentes laboratórios. Faz-se urgentemente necessária a padronização dos métodos, da origem de amostras e da definição dos níveis de risco para que os resultados possam ser analisados comparativamente ⁽³⁷⁾. Esforços no sentido de alcançar um consenso uniformizando métodos e parâmetros vêm sendo desenvolvidos e atualmente o corte aceito para intervenção terapêutica tem sido de 100 cópias de genoma/ 10^5 linfócitos no sangue ⁽³⁷⁾.

No estudo de Yang e cols (2000) os pacientes com DLPT ativa e em remissão após QTC ou suspensão da IS apresentaram correlação entre doença em atividade e CV-EBV, porém esta correlação não se manteve após o uso de Anti CD20 ⁽³¹⁾. Leucócitos infectados pelo EBV no sangue diferem das células tumorais da DLPT em relação à sensibilidade ao Anti CD20: células infectadas pelo EBV reduzem rapidamente em número enquanto que a resposta das células tumorais é variável. Linfócitos infectados pelo EBV são células em estado latente que expressam um conjunto restrito de antígenos virais, enquanto que as células tumorais proliferam ativamente e expressam a totalidade dos antígenos de latência, sugerindo assim que pertencem a compartimentos diversos. Neste estudo três de cinco pacientes que tiveram CV-EBV dramaticamente reduzida após o uso de Anti CD20 não apresentaram melhora clínica e houve progressão da doença.

1.5 Histórico

Os primeiros casos de DLPT foram identificados em transplante renal em 1968 por Doak e colaboradores ⁽³⁸⁾. Em 1962, Penn I e colaboradores reportaram cinco casos de DLPT em transplante renal de doadores vivos, apenas um sobrevivendo após redução da IS e radioterapia ⁽³⁹⁾. A terminologia DLPT foi inicialmente introduzida em 1984 por Starzl e colaboradores ⁽²⁵⁾ e, desde então, a mortalidade que girava em torno de 50% a 70% ⁽⁴⁰⁾ vem progressivamente sendo reduzida, principalmente com a incorporação precoce de novas modalidades terapêuticas, tais como o Anti CD20 ⁽⁴¹⁾.

1.6 Tratamento

Atualmente não existem resultados de estudos prospectivos randomizados suficientes, que permitam concluir qual a melhor opção terapêutica para DLPT na infância e adolescência. Várias abordagens têm sido utilizadas, porém o limitado número de pacientes, a heterogeneidade da doença e a necessidade de tratamentos personalizados não permitem estabelecer uma conduta padrão.

Erradicar a doença rapidamente e não aumentar o risco de rejeição aguda e crônica ao órgão transplantado, com um mínimo de efeitos adversos, são desafios no planejamento de estudos clínicos. Restaurar o sistema imune, controlar o EBV e destruir a célula tumoral são os principais objetivos do tratamento.

1.6.1 Redução da imunossupressão

Restabelecer a imunidade do receptor através da redução ou suspensão da IS tem sido a abordagem inicial na quase totalidade dos estudos e a resposta observada tem variado amplamente entre 20 a 73%, provavelmente devido ao uso de diferentes imunossupressores e ao risco variável de rejeição inerente aos diversos órgãos transplantados ⁽⁴²⁾.

Em pacientes com grande risco de rejeição ou naqueles em que o órgão transplantado é indispensável à sobrevivência, somente é possível reduzir a dose ou descontinuar um dos imunossupressores utilizados. A resposta clínica é variável e dependente do tipo de DLPT. Lesões precoces, especialmente em crianças, usualmente regridem com a redução da IS, porém a maior parte das DLPT monomórficas não responde satisfatoriamente e somente 50% das polimórficas o fazem. A associação com o EBV confere uma maior probabilidade de resposta comparada às EBV negativas; DHL elevada, estágio da doença com múltiplos órgãos envolvidos inclusive falência do órgão transplantado, além da presença de mutação no gene *BCL 6* e DLPT de ocorrência tardia, são considerados fatores preditivos de má resposta ⁽⁴³⁾.

O tempo médio para a resposta à redução da imunossupressão é de 3 a 4 semanas.

A redução antecipada da imunossupressão, guiada pelo monitoramento da carga viral de EBV, pode determinar uma redução significativa da incidência de DLPT através da reconstituição do controle imunológico pelas células T ⁽⁴⁴⁾. Considerando-se transplantes hepáticos que empreguem Tacrolimus e corticosteroides na IS, a redução da dose do primeiro, mantendo o nível sérico em 3

mg/mL, associada à suspensão do corticosteroide é, na atualidade, a terapêutica inicial para os pacientes com carga viral de EBV elevada ou DLPT ⁽⁴⁵⁾.

1.6.2 Quimioterapia Citotóxica

Em pelo menos 50% dos pacientes com DLPT, especialmente linfomas monomórficos e doença extensa, a agressão com quimioterapia citotóxica (QTC) é concebida ⁽⁴⁶⁾. Em um estudo com 36 pacientes pediátricos que não responderam a redução da IS foram utilizadas a ciclofosfamida e a prednisona em baixas doses com 83% de resposta global ⁽⁴⁷⁾. Entretanto, os pacientes transplantados com DLPT quando submetidos à QTC, desenvolvem toxicidade hematológica grave, provavelmente devido aos efeitos colaterais da imunossupressão prolongada sobre as funções renal e medular, além da maior susceptibilidade às infecções graves, consequentes ao sistema imune deficiente. Esta opção terapêutica é efetiva, porém a excessiva toxicidade e mortalidade deveriam limitar sua utilização precoce aos pacientes que apresentam doença tardia em relação ao transplante, tumores EBV negativos e/ou doença avançada e agressiva que necessitem de intervenção imediata ⁽⁴⁸⁾.

1.6.3 Anticorpos Monoclonais

Pelo exposto acima, os anticorpos monoclonais dirigidos aos antígenos B da membrana celular, significativamente menos tóxicos, se revelaram excelente opção terapêutica na DLPT CD20 positiva ⁽¹⁰⁾. O CD21, receptor usado pelo EBV para penetrar no linfócito B e o CD24, um antígeno expresso na membrana de células de linhagem B e de granulócitos foram os primeiros receptores alvo dos anticorpos monoclonais. Em um estudo francês, 58 pacientes adultos que apresentaram DLPT após TOS (n=31) e transplante de medula óssea (n=27), receberam anti CD21 e anti CD24 com resposta completa de 61% e sobrevida livre de doença de 46%, em um seguimento mediano de 61 meses ⁽⁴⁹⁾. Porém, estes anticorpos não se encontram mais disponíveis comercialmente e por serem de origem exclusivamente murino, foi

avertada a hipótese de uma redução de sua eficácia por determinarem a produção de anticorpos antimurinos humanos ⁽⁵⁰⁾.

O Anti CD20 é um anticorpo monoclonal quimérico murino/humano geneticamente produzido, dirigido ao anticorpo CD20 presente em linfócitos B normais e neoplásicos. Foi inicialmente aprovado em 1997 para o uso em adultos imunocompetentes no tratamento de linfomas não Hodgkin, foliculares e de baixo grau de células B CD20 positivos, recidivados ou refratários, aumentando substancialmente os níveis de resposta e reduzindo a toxicidade associada ao tratamento, quando comparado à terapêutica convencional ⁽⁵¹⁾. Na DLPT vem sendo utilizado com segurança e eficácia, isoladamente ou associado à QTC, tem reduzida atividade imunossupressora e exerce potencial ativação do sistema imune ⁽⁴⁸⁾. Em 1998, Fay e colaboradores reportaram o uso de Anti CD20 pela primeira vez em Pediatria com boa evolução e resposta completa em um paciente com Doença de Fanconi submetido a um CTH não relacionado compatível, que desenvolveu DLPT-EBV positiva de células B após 6 meses do procedimento ⁽⁵²⁾. O primeiro relato do uso de Anti CD20 em DLPT pós-TOS foi em 1999 por Cook et al que utilizou em 3 pacientes com linfoma difuso de grandes células B-DLPT após transplante de pulmão, com 2 RC e 1 ausência de resposta ^(40, 53). Em 2005, Oertel e cols, e Choquet e cols, publicaram os primeiros estudos prospectivos em crianças e adultos, que não responderam a redução da IS, comprovando a tolerância e eficácia desta droga ^(10, 54).

A resposta é variável e pacientes que apresentam lesões precoces como a hiperplasia plasmocítica ou linfoproliferações polimórficas são os que mais se beneficiam do uso desta droga ⁽¹⁰⁾. Entretanto, em DLPT tardia foram obtidas respostas parciais em dois de cinco pacientes e resposta completa em três de cinco pacientes quando utilizado em associação a cirurgia e radioterapia ⁽⁵⁵⁾.

O domínio murino Fab do Anti CD20 liga-se ao antígeno CD20, que é uma proteína transmembrana, localizada na membrana tanto de linfócitos maduros como neoplásicos. O mecanismo de citólise dos linfócitos alvo inclui apoptose, citotoxicidade complemento dependente e citotoxicidade celular anticorpo dependente. Este parece ser o mecanismo das citopenias pós Anti CD20, uma vez que neutrófilos e plaquetas são CD 20 positivos. Foi observado um caso de

neutropenia grau 4 com recuperação em 6 meses e não ocorreram episódios de infecção acima do esperado para esta população. Devido à depleção das células B faz-se necessária a dosagem periódica da Imunoglobulina G que deve ser administrada profilaticamente se níveis menores ou iguais a 400mg/dl. Os efeitos colaterais aqui mencionados estão relacionados à atividade hematológica do Anti CD20.

O antígeno CD20, alvo da atuação direta do anticorpo anti CD20 está envolvido, fisiologicamente, na regulação da condução do cálcio transmembrana, por vezes ocasionando hipocalcemia e intervindo na progressão do ciclo celular durante a ativação dos linfócitos B ⁽⁵⁶⁾ (**Figura 1**).

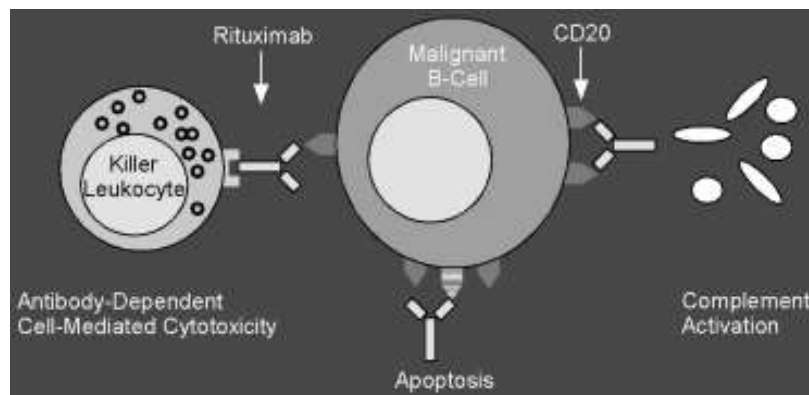


Figura 1 – Anti CD20 – Três potenciais mecanismos de ação: Apoptose, ativação do complemento e citotoxicidade celular anticorpo dependente.

FONTE: Svoboda, 2006 ⁽⁴⁸⁾.

O Anti CD20 é habitualmente administrado na dose de 375 mg/m²/semana x 4 por via intravenosa, lentamente. Não há necessidade de ajuste de doses na vigência de disfunção renal, pulmonar, hepática ou cardíaca. Recomenda-se o uso de acetaminofen e anti-histamínicos previamente à infusão, com o objetivo de prevenir eventual reação infusional a qual, quando ocorre, geralmente acontece na primeira administração, nas subsequentes tendendo a ser menos intensa e até a não se repetir ⁽⁵⁷⁾.

Em um estudo prospectivo em adultos, o uso expandido (por mais de 4 doses) de Anti CD20 elevou a RC a 60,5% ⁽⁵⁸⁾. Em uma população pediátrica de 14 pacientes refratários a redução da IS, DLPT recidivada e concomitante rejeição ao enxerto, este uso expandido foi utilizado prospectivamente, com 75% de RC ⁽⁵⁹⁾.

Uma vez que o Anti CD20 aumentou a eficácia da QTC em linfomas difusos *de novo* sua associação a outras modalidades terapêuticas aqui mencionadas, tais como a redução da IS, cirurgia, radioterapia, QTC e terapia celular, sua eficiência deve ser avaliada na DLPT, em estudos prospectivos randomizados de grande incorporação de pacientes.

Entre 70 a 80% das DLPT expressam o antígeno CD30 e terapias anti CD30 recentemente aprovadas como o Brentuximab Vedotin vem sendo estudadas em DLPT CD30 EBV positivo ⁽⁶⁰⁾.

1.6.4 Cirurgia e Radioterapia

Em pacientes com doença localizada, a ressecção cirúrgica completa quando possível, é considerada a mais efetiva e de menor morbidade das opções terapêuticas, porém excepcionalmente factível ⁽⁶¹⁾. Em pacientes com comprometimento multifocal esta modalidade foi eficiente em casos selecionados com doença não volumosa.

A hipertrofia adenoamigdaliana é uma manifestação frequente de DLPT na infância. O tecido adenoamigdaliano funciona como um reservatório para o EBV e a proliferação viral desencadeia em 90% dos casos uma hiperplasia que pode variar desde linfoproliferação semelhante à mononucleose até linfomas B agressivos ⁽⁶²⁾. A tonsilectomia permite o alívio dos sintomas obstrutivos e provê material adequado para o exame histopatológico ⁽⁶³⁾. Esta manifestação clínica de DLPT foi mais frequentemente observada em pacientes menores de um ano ⁽⁶⁴⁾. Lesões intestinais, que podem evoluir com perfuração após a resposta ao tratamento também devem ser ressecadas.

A radioterapia tem um papel limitado no tratamento da DLPT e tem sido utilizada quando da necessidade de respostas locais rápidas, como nos casos de obstrução de vias aéreas superiores por grandes massas tumorais ou compressão de outras estruturas vitais. Também pode ser efetiva em alguns casos de DLPT do Sistema Nervoso Central ⁽⁶⁵⁾.

1.6.5 Antivirais

O papel dos antivirais, no tratamento da DLPT é controverso, uma vez que raramente são utilizados sem a concomitância de outras intervenções (redução da IS) ⁽¹⁾. Noventa por cento das células infectadas pelo EBV são linfócitos B transformados que não entram em replicação lítica e o aciclovir e o ganciclovir não são efetivos *in vitro* em células B latentes. Entretanto, teoricamente é possível que o ganciclovir previna entre 5 a 10% de células B afetadas de entrar em replicação lítica e produzir novos vírions que poderiam infectar novos clones de células B.

A infecção por CMV é um fator de risco para o desenvolvimento da DLPT e é independente da intensidade da IS. Crianças que são soronegativas no momento do transplante e recebem o enxerto de um doador soropositivo para CMV tem grande risco de desenvolver DLPT ⁽¹⁴⁾. Pelo exposto, os antivirais, podem ter atividade na prevenção da DLPT.

Apesar dos resultados de estudos randomizados controlados sugerirem mínima contribuição da profilaxia com antivirais na redução da incidência de DLPT, vários estudos não randomizados mostraram benefício ⁽⁶⁶⁾. Para que a profilaxia com antivirais tenha impacto significativo na DLPT induzida pelo EBV, faz-se necessária a sua utilização anteriormente ou no momento da transmissão do EBV do doador ao receptor. A administração dos antivirais durante e por três meses após o uso do anticorpo anti-linfócito pode reduzir a incidência de DLPT.

Neoplasias associadas à forma latente do EBV são resistentes a antivirais análogos dos nucleosídeos (Aciclovir e Ganciclovir) uma vez que a enzima alvo destas drogas, a timidina-kinase (TK), não está expressa nesta fase. Entretanto linfócitos B-EBV latentes, quando expostos a arginina butirato, *in vitro*, tem a sua expressão de EBV-TK aumentada, tornando-se sensíveis ao Ganciclovir. Em um estudo de fase 1/2, em adultos, a combinação arginina butirato e Ganciclovir foi bem tolerada e demonstrou atividade biológica significativa em neoplasias linfoides refratárias associadas ao EBV ⁽⁶⁷⁾.

O Bortezomib, que também induz a ativação para a fase lítica do EBV é um potencial candidato a ser associado ao Ganciclovir para o tratamento da DLPT associada ao EBV, porém ainda em investigação ⁽⁴⁾.

Estudos clínicos comparativos randomizados seriam necessários para comprovar a eficácia da associação destas drogas.

1.6.6 Imunoterapia

1.6.6.1 Interferon

O interferon α é um imunoestimulante inespecífico e tem propriedade antiviral. Foi utilizado entre 1980 e 1990 em DLPT refratária, porém tem como efeito colateral a indução de rejeição ao enxerto e, diante da disponibilidade de novas opções terapêuticas, sua utilização foi abandonada.

1.6.6.2 Imunoglobulina intravenosa (IgIV)

O linfócito T citotóxico exerce um papel fundamental no controle da infecção por EBV, porém alguns estudos sugerem que os anticorpos estão também implicados no controle da rápida proliferação de células B infectadas pelo EBV. A ausência ou perda de anticorpos anti-EBV está fortemente associada ao desenvolvimento de DLPT em pacientes soro positivos para EBV pós TOS. Além disto, a infecção primária por EBV no período pós transplante não desencadeia o aparecimento de anticorpos anti-EBNA, induzindo à correlação entre a ausência deste e risco aumentado de DLPT. Observou-se uma redução da CV-EBV com o aumento do nível de anticorpos anti-EBNA, inclusive aqueles transferidos através de transfusões sanguíneas reiterando que os anticorpos estão, potencialmente, envolvidos nos mecanismos de proteção a DLPT EBV positivas. Baseados nestas observações, vários centros de transplante em Pediatria incorporaram o uso de IgIV nos regimes preventivos, porém aguardando resultados de estudos prospectivos randomizados que corroborem a incorporação definitiva desta alternativa terapêutica na prevenção desta enfermidade ⁽⁶⁸⁾.

1.6.6.3 Anticorpo anti-interleucina 6

A interleucina 6 (IL-6) tem sido descrita como um fator estimulador de crescimento de células B infectadas pelo EBV. Por este motivo, um anticorpo monoclonal anti-interleucina 6 foi testado em um estudo de fase I/II com boa tolerância e resposta completa observada em aproximadamente 40% dos pacientes refratários à redução da IS. Seu uso potencial rotineiro não está ainda, todavia, referendado ⁽⁶⁹⁾.

1.6.7 Terapia Celular

1.6.7.1 Célula T EBV – Específica

O equilíbrio entre a proliferação de células B infectadas pelo EBV e a função das CT-EBV específicas deve ser restaurado e mantido para a prevenção e tratamento da DLPT. O avanço dos estudos em genética molecular e a possibilidade de utilização da infusão de células T citotóxicas EBV específicas derivadas do receptor, cultivadas *in vitro*, oferece uma esperança, para o tratamento desta doença, porém o custo elevado e o tempo de, aproximadamente, 2 a 3 meses necessários à geração destas células, torna esta modalidade de tratamento pouco disponível em curto prazo ⁽⁷⁰⁾. O receptor na faixa etária pediátrica é, geralmente, soro negativo, o que inviabiliza a utilização desta técnica. Investigadores do Reino Unido transpuseram esta dificuldade estabelecendo um banco de células T EBV específicas congeladas de sangue periférico de doadores EBV positivos. Em um estudo multicêntrico de fase 2, estas células alogênicas, HLA parcialmente compatíveis, foram infundidas em pacientes com DLPT refratária à terapia convencional e os autores observaram resposta global de 64% em 5 semanas e sobrevida global de 52% em seis meses ⁽⁷¹⁾. A necessidade de imunossupressão em TOS é, por vezes, permanente, o que prejudica a expansão e persistência das CT-EBV específicas transferidas de um doador. Em modelos pré-clínicos, dois grupos superaram esta dificuldade, gerando células T EBV específicas resistentes aos inibidores do calcineurin (ciclosporina e tacrolimus) que, teoricamente, poderiam ser

utilizadas concomitantemente a imunossupressão em pacientes de alto risco para DLPT ^(72, 73).

Estas opções terapêuticas têm se mostrado promissoras e deverão permanecer em investigação e o estabelecimento de uma conduta padrão baseada no monitoramento da carga viral de EBV e das células T EBV específicas pode oferecer uma alternativa promissora ao manuseio da DLPT.

2 OBJETIVOS

2.1 Verificar a resposta tumoral à administração de Anti CD20 em pacientes com DLPT de células B, com expressão de CD20, pós transplante de órgãos.

2.2 Associar a neoplasia à eventual inclusão genômica de DNA/EBV na célula neoplásica.

3 MÉTODOS

Este estudo foi aprovado inicialmente pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da FMUSP em 27 de novembro de 2003, sob o título “Linfomas Não Hodgkin (LNH) Associados ao Vírus Epstein-Barr (EBV) em Crianças Transplantadas e/ou Infectadas Pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1): Caracterização de expressão Viral e Tratamento com o Emprego de anticorpos Anti CD20”. Posteriormente, pelas profundas diferenças clínicas existentes entre o grupo de pós-transplantados e os portadores de HIV, embora tendo a deficiência imunológica como base, estes últimos foram excluídos. O projeto foi novamente submetido à apreciação de CAPPesq com o novo título “Linfomas Não Hodgkin (LNH) Associados ao Vírus Epstein-Barr (EBV) em Crianças Transplantadas: Caracterização de expressão Viral e Tratamento com o Emprego de anticorpos Anti CD20”, sendo aprovado em 23 de janeiro de 2014.

3.1 Casuística

Neste estudo retrospectivo, observacional e descritivo, foram analisados os prontuários de registro hospitalar de 23 pacientes com idade inferior a 18 anos que foram admitidos na Unidade de Internação do Serviço de Onco-Hematologia do Instituto da Criança (ICR) e Instituto do Tratamento do Câncer Infantil (ITACI) e que desenvolveram DLPT CD20 positiva pós TOS, comprovada histologicamente, no período de 08/03/1995 a 13/08/2011. Estes pacientes eram provenientes das Unidades de Transplante do Instituto do Coração da Fundação Zerbini (sete pacientes), da Unidade de Transplante Renal do Departamento de Clínica Médica da FMUSP (cinco pacientes), da Unidade de Transplante Hepático do Instituto da Criança do Hospital de Clínicas da FMUSP (dez pacientes) e do Serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) da Universidade Federal do Paraná (um paciente). Todos transplantados entre 01/03/1993 e 01/09/2010. O tempo médio de seguimento foi de 3,24 anos e a data limite desta análise foi 18 de agosto de 2011. O consentimento esclarecido foi obtido previamente ao levantamento dos dados.

3.1.2 Critérios de Inclusão

Pacientes com até 18 anos completos.

Pacientes com diagnóstico de Linfoma não Hodgkin de células B, com expressão de CD20, pós transplante de órgãos sólidos e ou transplante de Célula Tronco Hematopoiética.

Ausência de qualquer recurso terapêutico específico associado, exceto suspensão e ou diminuição da imunossupressão.

3.2 Diagnóstico de DLPT

Todos os pacientes foram avaliados clínica e laboratorialmente, o que permitiu suspeitar de DLPT. Exames de imagem tais como tomografia computadorizada do tórax, abdômen e pelve, além de hemograma e bioquímica sérica, foram parte da avaliação de rotina. A Biópsia tecidual por aspiração e ou excisional de linfonodos aumentados e/ou visceromegalias foi realizada, bem como biópsia e/ou aspiração de medula óssea. Tomografia computadorizada do crânio, coleta de líquido cefalorraquidiano (LCR) para análise citológica e bioquímica, broncoscopia e endoscopia digestiva foram efetuados quando indicados a critério médico.

3.2.1 Anatomopatologia

Para o diagnóstico da DLPT a biópsia tecidual é necessária e o critério morfológico utilizado para classificá-las foi o de Frizzera ⁽⁷⁴⁾ e Knowles ⁽⁷⁵⁾ e da OMS revisada e atualizada em 2001 e 2008 ⁽²⁹⁾. Coloração para imunoglobulinas e citometria de fluxo foram realizadas sempre que possível.

3.2.2 Detecção do genoma de EBV

A análise de incorporação tumoral de EBV foi realizada de modo sistemático no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Nos vinte e três pacientes houve a detecção viral por hibridização *in situ* cromogênica e da proteína de latência viral LMP1 em seus blocos parafinados teciduais¹.

3.3 Tratamento

Todos os pacientes foram tratados inicialmente com redução da IS, que foi programada especificamente para cada caso conforme o tipo de transplante e IS utilizada no momento do diagnóstico de DLPT. Em geral consistia na suspensão da Azatioprina ou MMF e redução da ciclosporina, tacrolimus e prednisona.

Quimioterapia citotóxica específica foi utilizada para os diferentes subtipos histológicos quando a gravidade dos sintomas não permitia aguardar o período necessário a observação de resposta à redução e ou suspensão da IS e ainda quando não houvesse a disponibilidade do Anti CD20 para uso imediato. No Brasil o Anti CD20 foi comercializado por volta dos anos 2000. Dezesesseis pacientes receberam Anti CD20 dos quais quatro transplantados de rim, quatro de coração, sete de fígado e um pós TMO. Sete pacientes não receberam Anti CD20 dos quais três transplantados de coração e quatro de fígado.

Para os Linfomas de Burkitt as drogas utilizadas foram Vincristina, Ciclofosfamida, corticosteroides, VM-26 e Aracytin (ARA C) e para os demais subtipos de Linfomas Não Hodgkin as drogas consistiram basicamente de Vincristina, alta dose de Metotrexate, VM-26 e ARAC, Ciclofosfamida, administração de QTC intratecal para prevenção de doença no sistema Nervoso Central e 6-mercaptopurina (6MP).

O único paciente com Linfoma de Hodgkin transplantado de medula óssea recebeu apenas Anti CD20 para tratamento da DLPT.

¹ Revisão metodológica: A pesquisa do vírus do Epstein-Barr (EBV) pela reação de hibridização *in situ* realizada no Núcleo de Patologia Quantitativa – Centro de Patologia – Instituto Adolfo Lutz. Shirata NK; Kimura LM; Guerra JM; Paes RAP; Menezes Y; Alves VAF; Nonogaki S. BEPA, 9(107):18-22, 2012.

Anti CD20, quando disponível, foi utilizado no esquema habitual de 375mg/m²/dose semanal durante 4 semanas por via endovenosa precedido das medidas preventivas para anafilaxia com Acetaminofen e anti-histamínico. As reações alérgicas foram pouco frequentes e responsivas ao tratamento preconizado com corticosteroides e redução da velocidade de infusão. A imunoglobulina intravenosa foi administrada profilaticamente sempre que os níveis se mostraram inferiores a 400mg%. Distúrbios metabólicos expressivos não foram verificados.

Reavaliações com exames de imagem e CV/EBV por PCR foram realizadas em intervalos irregulares após algumas etapas do tratamento e utilizadas como parâmetros de resposta. Nenhum paciente foi submetido à FDG-PET (*flúor-deoxi-2-glicose-positron emission tomography*).

Resposta completa (RC) foi definida como o desaparecimento de qualquer evidência de doença e não surgimento de lesões novas.

Resposta parcial (RP) definida como redução de 50% nas dimensões das lesões detectadas ao diagnóstico, além da ausência de lesões novas.

Doença estável (DE) menos de 25% de redução das lesões tumorais na ausência de lesões novas.

Doença progressiva (DP) aumento de 25% nas dimensões das lesões e/ou aparecimento de lesões novas.

3.4 Análise Estatística

As variáveis estudadas foram: idade; sexo; tipo de transplante (hepático, cardíaco, renal, de medula óssea); tipo de doença (monomórfica, polimórfica); uso de Anti CD20 (sim, não) e DLPT (precoce, tardia).

Para os dados do estudo, inicialmente foi realizada uma análise estatística descritiva para as variáveis contínuas, apresentando-se a média, a mediana, o valor mínimo, o valor máximo, além do desvio-padrão como medida de variabilidade

absoluta. Para as variáveis categóricas são apresentados os respectivos percentuais.

O tempo de sobrevida foi calculado considerando o intervalo de tempo desde a entrada do paciente no estudo (data do diagnóstico da doença) até a ocorrência do óbito, censura ou o final do estudo. O tempo de sobrevida livre de eventos foi considerado até a ocorrência de recidiva.

O estimador de Kaplan-Meier foi utilizado para determinar a sobrevida acumulada e a sobrevida livre de eventos em 1, 2 e 5 anos. O teste de *log-rank* foi utilizado para comparação das curvas de sobrevida.

O nível de significância considerado foi de 5% e todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistica 9.1.

4 RESULTADOS

Entre março de 1995 e setembro de 2010 foram admitidos na Unidade de internação do Serviço de Onco-Hematologia do ICR e posteriormente no ITACI, um total de vinte e dois pacientes pós-TOS e um pós TMO com sinais e sintomas sugestivos de DLPT, subsequentemente confirmados por exames histopatológico e imunoistoquímico, bem como avaliação de carga viral de EBV por PCR. A média de idade na ocasião do transplante era 5,79 anos e a mediana de 3,73 (Min: 0,2 – Max 16,53 – desvio padrão 5,16). Oito pacientes do sexo feminino (34,78%) e quinze do sexo masculino (65,22%). Sete pacientes eram transplantados de coração (30,43%), dez de fígado (43,48%), cinco de rim (21,74%) e um de medula óssea (4,35%)(semi ablativo). As adenopatias e /ou massas tumorais que representaram a queixa inicial mais frequente, foram biopsiadas em 100% dos casos e a histopatologia revelou doença polimórfica em 5 casos (21,74%) e monomórfica em 18 casos (78,26%). Febre, alteração de enzimas hepáticas, pancitopenia, monoteste positivo e biópsia anormal do enxerto foram observadas. Nenhum paciente apresentou envolvimento confirmado do órgão transplantado por DLPT. As anormalidades observadas em biópsias do enxerto, quando realizadas, foram sugestivas de rejeição aguda ou crônica que, via de regra, foi tratada com pulsos de corticosteroide e/ou reintrodução da IS com dose reduzida ou ainda substituição por outro imunossupressor.

Na avaliação inicial, a maior parte dos pacientes apresentou doença avançada nodal e ou extranodal (estádios II, III ou IV de Murphy) (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Estadiamento de Murphy para LNH

Estádio	Descrição
I	Um único tumor extranodal ou uma única cadeia ganglionar, excluindo mediastino e abdômen.
II	Um único tumor extranodal com gânglios regionais acometidos, do mesmo lado do diafragma. <ul style="list-style-type: none"> - Duas ou mais cadeias ganglionares do mesmo lado do diafragma - Duas áreas extranodais com ou sem comprometimento ganglionar do mesmo lado do diafragma - Tumor gastrointestinal (em geral ileocecal) com ou sem gânglios mesentéricos macroscopicamente ressecados.
III	Duas ou mais áreas nodais de ambos os lados do diafragma <ul style="list-style-type: none"> - Duas ou mais áreas extranodais de ambos os lados do diafragma - Tumores intratorácicos (mediastino, pleura, timo) - Tumores que acometerem difusamente o abdômen - Tumores epidurais ou para espinhais independente do local primário
IV	Qualquer tumor que apresente comprometimento medular <25% e/ou com acometimento de sistema nervoso central.

Fonte: Adaptado de Murphy ⁽⁷⁶⁾.

Todos os pacientes expressavam CD20 e eram EBV positivos. Estudos de clonalidade não foram procedidos nesta amostra. Os vinte e três pacientes estudados apresentaram a presença da proteína de latência viral de EBV LMP1 na célula tumoral detectada pelo método de imunistoquímica em blocos de parafina armazenados ao diagnóstico de DLPT.

O diagnóstico da DLPT ocorreu em média 3,89 anos pós TOS (Mediana = 2,2 anos; Desvio-padrão=4,01 anos; Mínimo=0,08 anos; Máximo=13,11 anos). As recidivas ocorreram uma vez em 1 paciente, duas vezes em 2 pacientes e mais vezes em 1 paciente.

A **Tabela 3** apresenta as principais características dos 23 pacientes analisados. A seguir serão descritos conforme o tipo de transplante a que foram submetidos.

Tabela 3 – Características clínicas dos pacientes estudados

Caso	Sexo	Idade anos	Doença de base	Tipo de transplante	Imunossupressão	Manifestação clínica	DLPT Histologia	Estadio (Murphy)	EBV no tumor	Intervalo desde o transplante (anos)	Tratamento DLPT	Uso de antivirais	Resposta	Uso de Ig IV	Recidiva	Status atual
1	F	0,3	VU	Cardíaco	C	NP	LNH MALT	II	Não	13,11	Anti CD20 2X	Não	RC	Sim		V (64 m)
2	F	0,2	MV	Cardíaco	C	LC	LBurkitt	I	Sim	7,52	Anti CD20 4X+QTC	ACV	RC	Sim		V (34 m)
3	F	3,7	CD	Cardíaco	C + A	SF+MO	LBurkitt	IV	NR	3,28	QTC	Não	RC	Não		O (25 m) ¹
4	M	2,3	CV	Cardíaco	C + A	MA+DP+MO	LBurkitt+MO	IV	NR	4,17	QTC	Não	RC	Sim		V (140 m)
5	M	2,9	CD	Cardíaco	T + A	MA	LBurkitt	III	Sim	2,43	Anti CD20 4X+QTC	GCV	RC	Sim	1	V (12 m)
6	F	6,4	CD	Cardíaco	T + C + P	LC	LBurkitt-Like	III	Sim	10,88	Nenhum	GCV	NA	Não		O (1 m) ²
7	M	0,5	CD	Cardíaco	C	NP	DLP polimórfica	III	Sim	9,98	Anti CD20 4X	GCV	RC	Sim	5	V (70 m)
8	M	1,0	AVB	Hepático	T	MA	LNH B	III	Sim	6,95	Anti CD20 4X	GCV	RC	Sim	2	V (37 m)
9	M	1,6	AVB	Hepático	T + CE	HAd	DLP polimórfica	I	Sim	0,23	RI	GCV+ACV	RC	Não		V (84 m)
10	F	10,5	FHC	Hepático	C + T	MA	LNH B	III	NR	1,12	Anti CD20	GVC	RP	Não		O (4 m) ¹
11	F	4,0	AVB	Hepático	T + CE	LC	DLP polimórfica	I	Sim	2,20	Anti CD20 4X	ACV	RC	Sim	2	V (113 m)
12	M	1,4	CC	Hepático	T + C + CE	LC	DLP polimórfica	II	Sim	1,67	RI	GCV+ACV	DP	Não		O (4m) ²
13	M	3,7	AVB	Hepático	T	MA+O	LBurkitt	III	Sim	6,89	Anti CD20+QTC	ACV	RC	Não		V (111 m)
14	M	12,1	HF	Hepático	C + CE	LA	LNH B	II	Sim	0,22	Anti CD20 4X	ACV	RC	Não		V (12 m)
15	F	1,3	AVB	Hepático	T	HAm	LNHGC-B	I	Sim	0,25	Anti CD20 4X	GCV	RC	Não		O (4 m) ³
16	F	15,1	CAI	Hepático	T + CE	MA	LBurkitt	II	Sim	6,50	RI	Não	NA	Não		O (2 m) ³
17	M	1,3	AVB	Hepático	T + CE	LC	LNHGC-B	II	Sim	0,35	Anti CD20 4X	ACV	RC	Sim		V (9 m)
18	M	16,5	DH	MO alo (SA)	C + MMF	E	DLP	I	Sim	0,08	Anti CD20 4X	VGCV	RC	Não		V (48 m)
19	M	6,5	SN	Renal	MMF + T + CE	MA+LC	LNHGC-B	III	Sim	0,61	Anti CD20 4X	GCV+ACV	RC	Sim		V (49 m)
20	M	8,2	HRB	Renal	MMF + T + CE	LC	LNHGC-B	I	Sim	0,46	Anti CD20	ACV	RC	Sim		V (126 m)
21	M	12,3	SN	Renal	MMF + C + CE	LC	DLP polimórfica	II	Sim	8,44	Anti CD20	ACV	RP	Sim		O (16 m) ³
22	M	11,5	MCR	Renal	MMF + T + CE	MA	LNHGC-B	III	Sim	0,95	Anti CD20 4X	Não	RC	Não		V (1 m)
23	M	9,9	NCB	Renal	MMF + C + CE	LA	LNHGC-B	III	Sim	1,12	QTC	ACV	RC	Sim		V (123 m)

VU, Ventrículo único; MV, Miocardite viral; CD, Cardiopatia Dilatada; CV, Cardiopatia viral; AVB, Atresia de vias biliares; FHC, Fibrose hepática congênita; CC, Cirrose criptogênica; HF, Hepatite Fulminante; CAI, Cirrose auto imune; DH, Doença de Hodgkin; SN, Síndrome Nefrótica; HRB, Hipoplasia Renal Bilateral; MRC, Malformação renal congênita; NCB, Necrose cortical bilateral; SA, semiablativo; CE, corticosteróides; FK506, tacrolimus; C, ciclosporina; MMF, micofenolatomofetila; A, azatioprina; P, pirimetamina; RC, remissão completa; DE, doença estável; NA, não aplicável; DP, doença progressiva; RP, remissão parcial; NP, Nódulos pulmonares; LC, Linfonodos cervicais; SF, seios da face; MO, medula óssea; MA, massa abdominal; HAd, Hipertrofia de adenóides; O, órbita; LA, linfonodos axilares; HAm, Hipertrofia de amígdalas; E, estomago; LNHC-B, LNH grandes células B; RI, redução imunossupressão; QTC, quimioterapia citotóxica; ACV, aciclovir; GCV, ganciclovir; VGCV, valganciclovir; ¹Rejeição ao transplante; ²DP; ³SEPS.

4.1 DLPT em Transplante Cardíaco

Dentre os sete pacientes submetidos a transplante cardíaco, 4 (57,14%) eram do sexo masculino e as causas que determinaram a necessidade do mesmo foram predominantemente cardiopatia congênita, miocardite viral e miocardiopatia dilatada.

A imunossupressão utilizada previamente ao diagnóstico de DLPT consistia de azatioprina (AZT) + ciclosporina em dois pacientes, somente ciclosporina em 3 pacientes, tacrolimus+ pirimetamina + ciclosporina em 1 paciente, tacrolimus + azatioprina em 1 paciente.

Quatro pacientes desenvolveram Linfoma de Burkitt e um Burkitt-like sendo um deles com envolvimento de MO, um LNH, subtipo MALT – 1 e doença polimórfica.

Nenhum paciente apresentou doença nos primeiros dois anos pós TOS, considerada apresentação precoce, todos tiveram apresentação tardia (> 2anos).

Todos os pacientes foram submetidos à redução da IS e um fez uso de Aciclovir, três de Ganciclovir e três não receberam antivirais.

No momento desta análise cinco (71,43%) pacientes permaneciam em seguimento e em RC, dentre os quais quatro (80%) que receberam Anti CD20. Dois (28,53%) pacientes que foram a óbito não haviam recebido Anti CD20.

4.2 DLPT em Transplante Hepático

Dez pacientes, sendo 6 (60%) do sexo masculino, foram submetidos a transplante hepático entre 15/06/1995 a 12/05/2010, dos quais 6 (60%) em consequência a atresia de vias biliares, 1 (10%) por fibrose hepática congênita, 2 (20%) por cirrose criptogênica (1) e autoimune (1) e (1) (10%) hepatite fulminante.

A IS utilizada previamente ao diagnóstico de DLPT constava de tacrolimus isoladamente (4), tacrolimus associado a corticosteroides (CE) (3); tacrolimus + CE + ciclosporina (1), ciclosporina e CE (1), Ciclosporina inicialmente (1) que posteriormente passou a usar tacrolimus.

A DLPT se manifestou com Linfoma de Burkitt em dois pacientes; LNH em cinco e doença polimórfica em três pacientes. Em seis pacientes a apresentação foi antes de dois anos pós TOS e em quatro dois anos após o transplante. Todos foram submetidos à redução da IS, 6 receberam Anti CD20, um paciente com LNH foi submetido à QTC associada ao Anti CD20 e quatro não fizeram uso do Anti CD20, Ganciclovir ou Aciclovir foram usados (exceto em um paciente) e um paciente que apresentava amigdalite de repetição, foi submetido à amigdalectomia.

Quatro dentre os seis pacientes que usaram Anti CD20 apresentaram níveis IgG < 400 mg% e receberam IgG intravenosa na dose de 400 mg/kg/dose, sempre que necessário.

Por ocasião desta análise 2 pacientes que não utilizaram Anti CD20 haviam evoluído para o óbito. Dentre os 6 pacientes que utilizaram Anti CD20, um foi a óbito por rejeição crônica confirmada por biópsia e sepse, e um por sepse isolada, os outros quatro se encontravam em seguimento em RC. Um paciente com doença polimórfica foi submetido à redução IS isolada e obteve remissão completa da doença.

4.3 DLPT em Transplante Renal

Cinco pacientes, todos do sexo masculino, foram submetidos a transplante renal entre dezembro de 1995 (1 paciente) e os 4 demais entre os anos 2000 e 2010.

As doenças que motivaram o procedimento foram Síndrome Nefrótica (SN) (1), SN + IRC (1), Hipoplasia Renal Bilateral (1), malformação congênita renal (1), necrose cortical bilateral (1)

A IS prévia ao diagnóstico de DLPT constava de MMF + tacrolimus + CE em três pacientes, MMF + Ciclosporina + CE (2)

A DLPT se manifestou como LNH de grandes células em quatro pacientes e um LNH de caracterização morfológica não definida e todos apresentavam positividade para EBV no tumor.

Doença antes de dois anos: 4 pacientes

Doença após dois anos: 1 paciente

Os cinco pacientes foram submetidos à redução da IS, quatro (80%) receberam Anti CD20 e um (20%) QTC e todos utilizaram antivirais: quatro utilizaram Aciclovir e um Aciclovir + Ganciclovir. Os quatro pacientes que usaram Anti CD20 apresentaram dosagem de IgG menor que 400 mg% e receberam IgG IV profilática, sempre que necessário.

Por ocasião desta análise, quatro pacientes (80%) se encontravam em seguimento com resposta completa, um deles ainda em tratamento e um paciente, transplantado em 1995, que recebeu Anti CD20, evoluiu para óbito por sepse sem foco aparente ou microrganismo isolado, somente Parvovirose e EBV.

4.4 DLPT em Transplante de Medula Óssea

Um paciente do sexo masculino com dezesseis anos foi submetido a transplante alogênico semi ablativo de medula óssea em 14/07/2007 por recidiva de doença de Hodgkin pós TMO autólogo. A doença foi de aparecimento precoce, um mês após o procedimento na forma monomórfica (LH) e EBV positiva no tumor. A IS utilizada consistiu de MMF e ciclosporina.

Recebeu Anti CD20 nas doses e intervalos habituais e Ganciclovir + Aciclovir com boa resposta e no momento desta análise se apresentava em remissão completa.

4.5 Uso do Anti CD20

Na **tabela 4** foram analisados os pacientes que usaram ou não usaram Anti CD20 para doença monomórfica ou polimórfica.

Tabela 3 - Cruzamento das variáveis: Anti CD20 e tipo histológico de DLPT (Monomórfica ou Polimórfica)

Variáveis	Tipo de doença	
	Monomórfica	Polimórfica
Usou	13	3
Não usou	5	2
Total	18	5

4.6 Carga Viral de EBV

Dentre os dezesseis pacientes que fizeram uso de Anti CD20, quatorze (87,50%) tiveram a detecção ou dosagem sanguínea da CV-EBV por PCR qualitativo ou quantitativo ao diagnóstico, no decorrer da doença e no seguimento após a alteração da IS, uso do Anti CD20 isoladamente ou associado à QTC e antivirais. As amostras foram coletadas do sangue periférico e não obedeceram a intervalos regulares previamente estabelecidos, porém, via de regra, revelaram a detecção ou elevação da carga viral ao diagnóstico da DLPT, acompanharam a resposta clínica às medidas terapêuticas, além de orientar na reintrodução da IS e na ocorrência de recidivas. Um paciente teve a detecção do EBV por sorologia e FISH do tumor. Dentre os sete pacientes que não receberam Anti CD20, em três, embora não houvesse a detecção da CV-EBV no sangue, a hibridização *in situ* cromogênica para EBV no tumor revelou a presença da partícula viral e outros quatro pacientes que também não receberam Anti CD20 foram monitorados com CV-EBV de forma irregular e quando detectadas, os níveis se mostraram elevados ao diagnóstico e reduziram após as medidas terapêuticas instituídas em dois pacientes. Entre dois pacientes que apresentaram PCR positiva ao diagnóstico, um evoluiu para o óbito em 10 dias por insuficiência respiratória sem segunda coleta e o outro respondeu ao uso de QTC, porém não teve documentação da redução da carga viral.

4.7 Sobrevida Global (SG)

A SG para a população total dos pacientes foi de 76,92% em um ano e 65,47% em 5 anos (**Figura 2**).

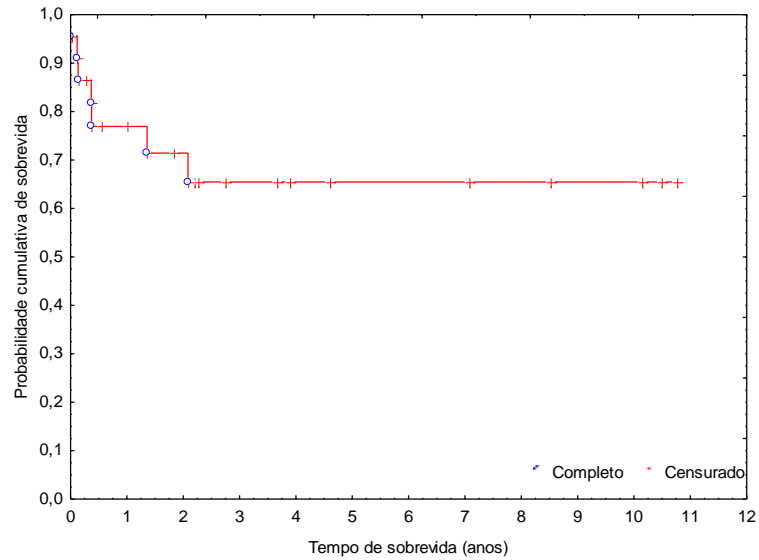


Figura 2 – Sobrevida Global dos pacientes estudados.

Onze (47,83%) pacientes apresentaram DLPT durante os primeiros dois anos pós TOS, considerada precoce e doze (52,17%) pacientes após este período com SG em dois anos de 68,42% e 60,57% respectivamente, não tendo sido observado diferença estatística significativa (**Figura 3**).

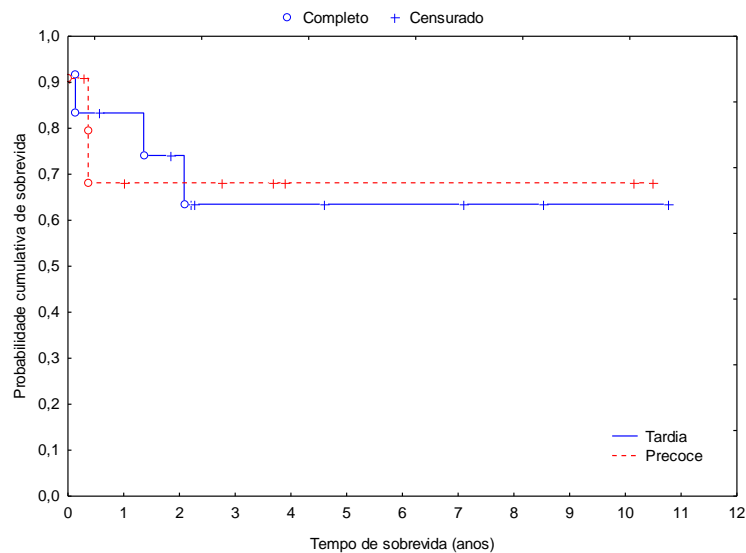


Figura 3 – Sobrevida Global dos pacientes com apresentação tardia ou precoce.

A SG em dois anos para a doença monomórfica foi de 62,25% e de 75% para a polimórfica (**Figura 4**).

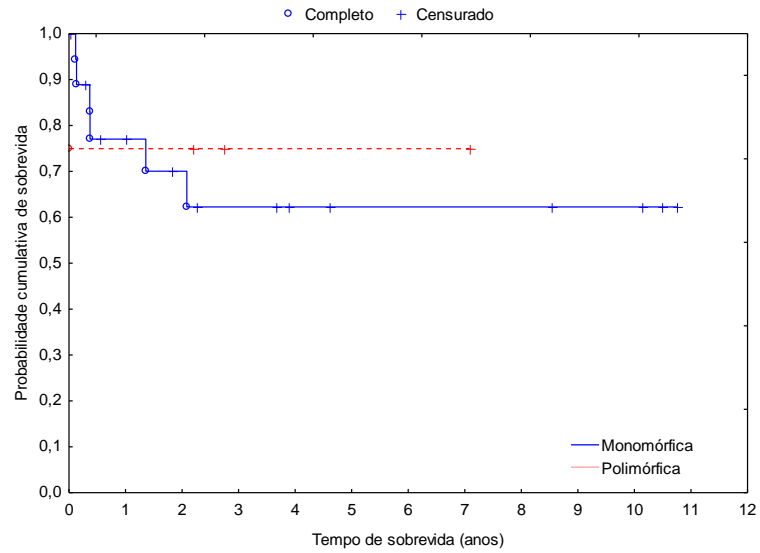


Figura 4 – Sobrevida Global dos pacientes estudados com doença monomórfica e polimórfica.

Dentre os dezesseis pacientes que receberam Anti CD20, quatorze obtiveram resposta entre completa e parcial, perfazendo uma SG de 81,45% em dois anos, dois foram a óbito, um consequente a rejeição e outro a sepse (**Figura 5**). Existe diferença significativa (teste log rank: $p=0,02$) na sobrevida global quando se compara o grupo que usou com o que não usou Anti CD20.

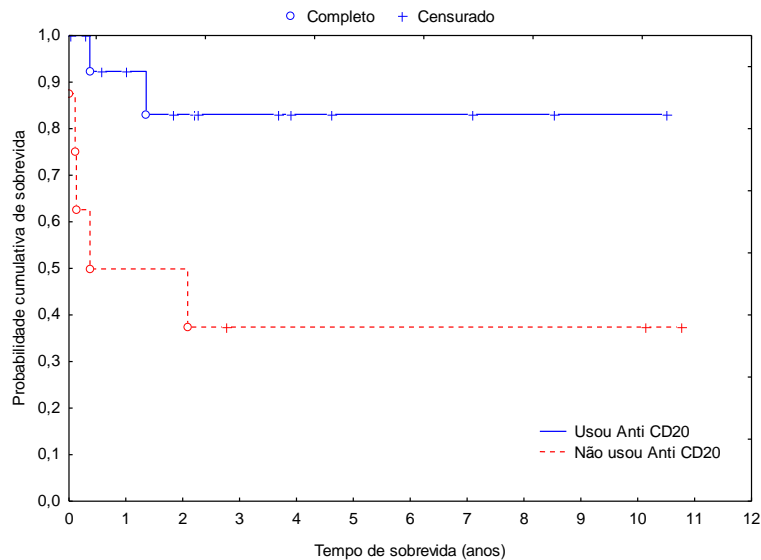


Figura 5 – Sobrevida Global dos pacientes que receberam ou não Anti CD20

A Curva de sobrevida global dos pacientes que fizeram uso exclusivo de Anti CD20 (**Figura 6**). A probabilidade de sobrevida em 1,3 anos ou mais foi de 71,59% (erro-padrão=13,96%).

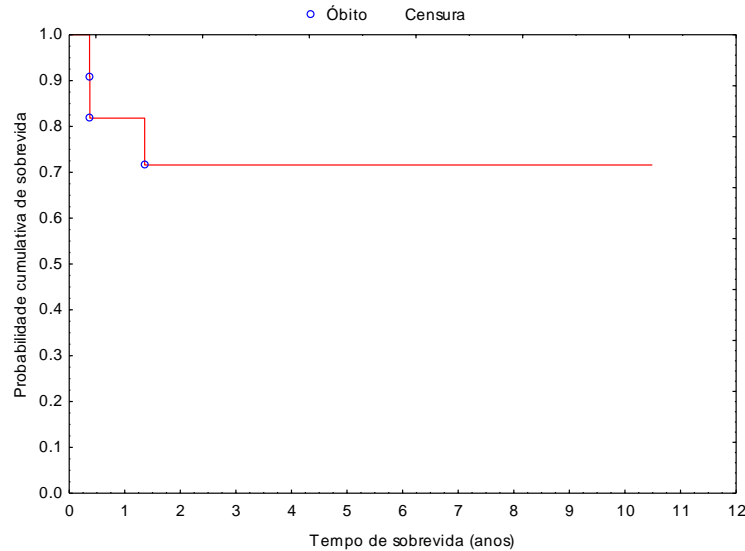


Figura 6 – Sobrevida Global dos pacientes que fizeram uso exclusivo de Anti CD20

A Curva de SG comparando os pacientes que usaram e os que não usaram o Anti CD20, considerando apenas doença monomórfica, foi de 77,92% e 33,33% respectivamente, em 2 anos (**Figura 7**).

Observa-se diferença estatística significativa quando se compara os grupos pelo teste de log-rank ($p=0,04$).

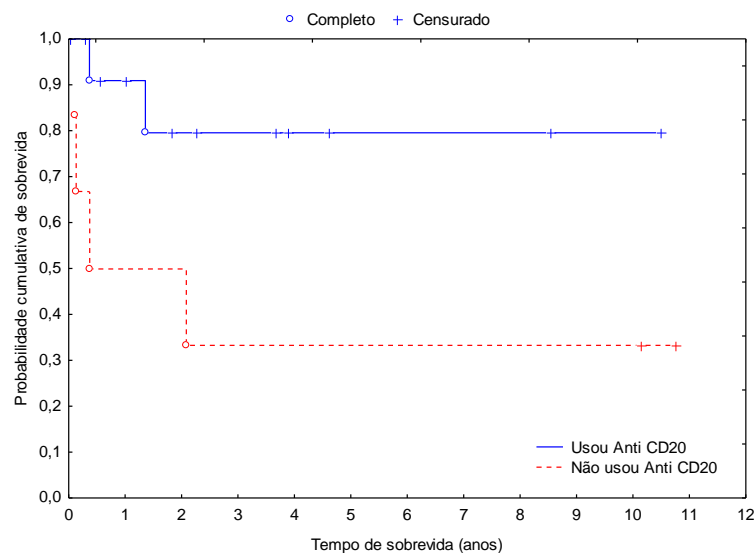


Figura 7 – Sobrevida Global dos pacientes com doença monomórfica que usaram ou não Anti CD20

Em relação ao uso de Anti CD20 dos 11 pacientes que apresentaram doença precoce 7 (63,64%) receberam a droga e dentre os 12 com doença tardia, 8 (66,67%) fizeram uso do mesmo. Comparando as curvas de sobrevida não é possível detectar diferença significativa (log-rank teste) ($p=0,65$) devido ao tamanho reduzido da amostra. Assim sendo, observa-se que há uma tendência de maior sobrevida em dois anos ou mais (85,5%) na doença tardia em relação à doença precoce, porém seria necessária uma amostra maior para evidenciar estatisticamente (**Figura 8**).

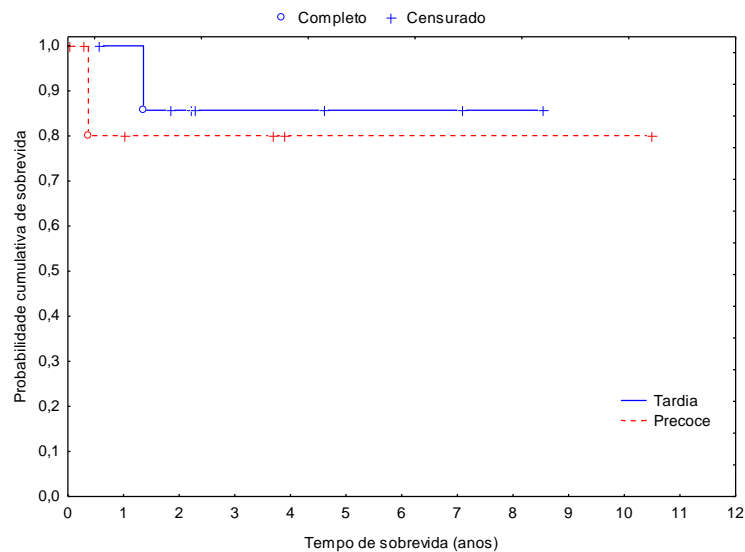


Figura 8 – Sobrevida Global dos pacientes com doença tardia ou precoce que receberam Anti CD20

4.8 Sobrevida Livre de Eventos (SLE)

O sucesso do tratamento da DLPT requer não só a remissão completa da doença, como também a prevenção da rejeição aguda ou crônica ao órgão transplantado. Por este motivo a SLE definida por não ocorrência de morte, perda do enxerto e/ou recidiva da doença deve ser cuidadosamente avaliada.

A SLE em seis meses foi de 67,51%, em um ano de 57,87% e em cinco anos de 46,76% (**Figura 9**).

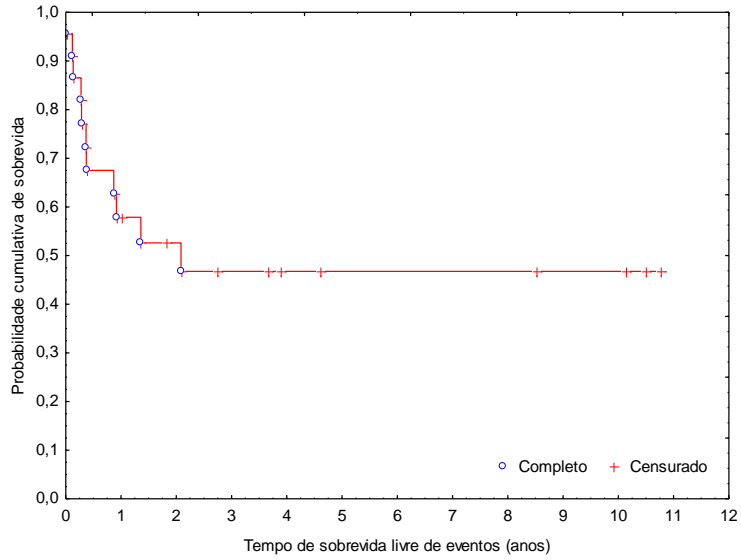


Figura 9 – Sobrevida Livre de eventos dos pacientes estudados.

A SLE, em 2 anos, foi 68,42% e 31,82%, para os pacientes com apresentação precoce e tardia respectivamente (Figura 10).

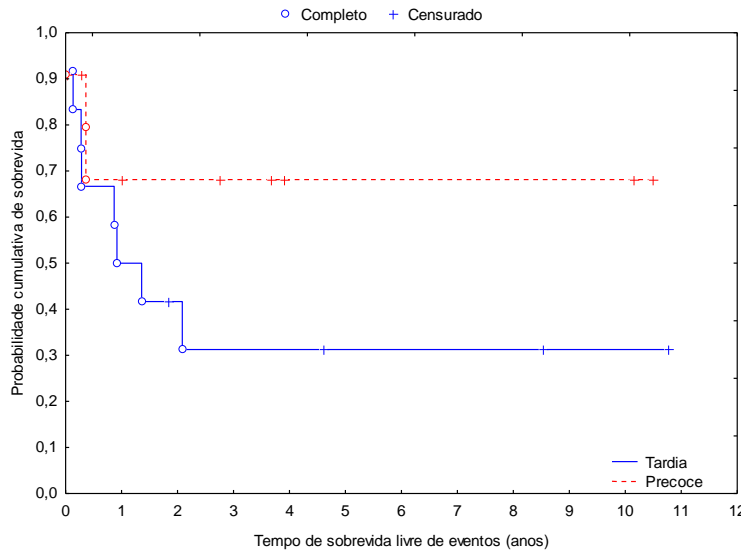


Figura 10 – Sobrevida Livre de eventos dos pacientes com apresentação tardia ou precoce.

A SLE em 2 anos para quem recebeu Anti CD20 foi 53,27% e, para quem não recebeu, foi 37,5% (Figura 11).

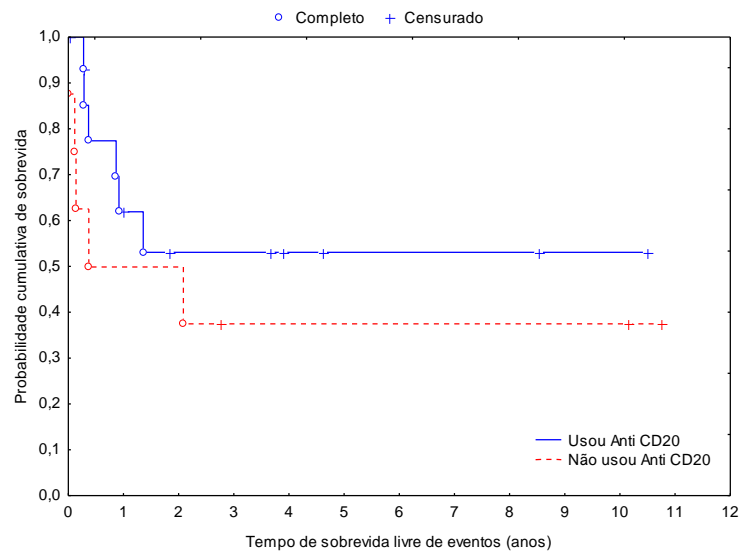


Figura 11 – Sobrevida Livre de eventos dos pacientes que receberam ou não Anti CD20

A SLE para doença monomórfica e polimórfica foi de 51,56% e 25%, respectivamente (**Figura 12**).

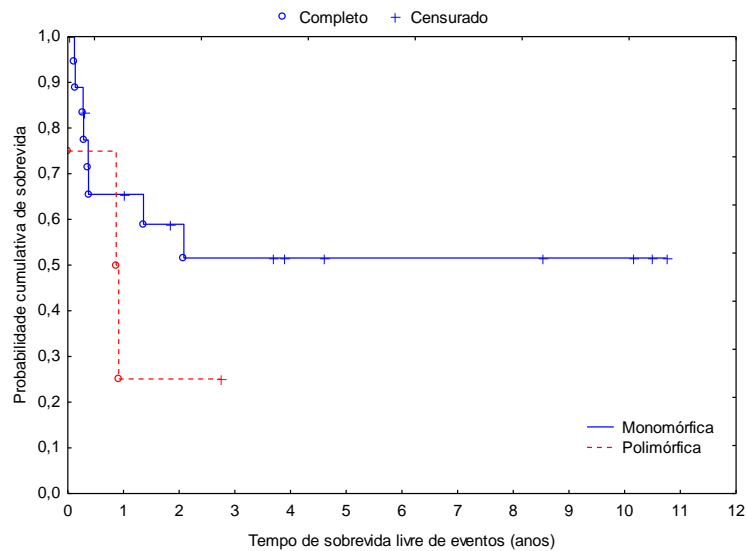


Figura 12 – Sobrevida Livre de Eventos dos pacientes com doença monomórfica e polimórfica.

As curvas de SLE para quem recebeu ou não recebeu Anti CD20 considerando apenas doença Monomórfica, sendo 62,54% e 33,33%, respectivamente, em 2 anos. Não se observou diferença estatística e significativa quando se compara os grupos (**Figura 13**).

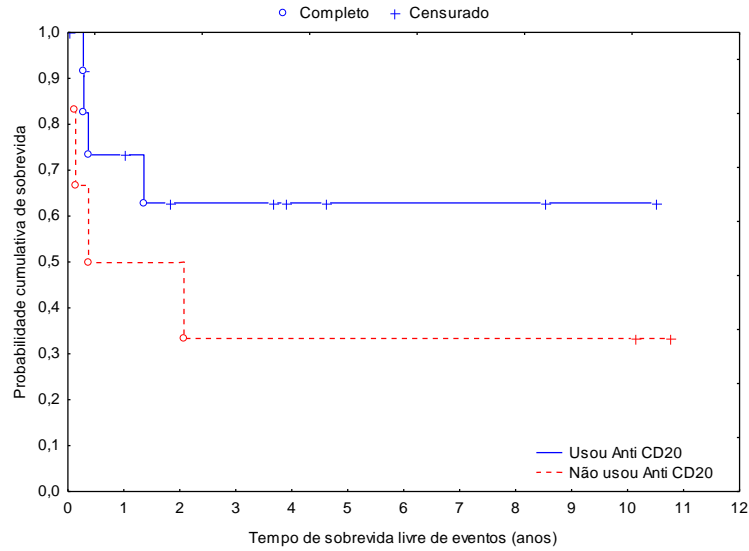


Figura 13 – Sobrevida Livre de eventos dos pacientes que receberam ou não Anti CD20.

Curva de sobrevivência livre de eventos dos pacientes que fizeram uso exclusivo de Anti CD20 onde a probabilidade de sobrevivência em 1,3 anos foi de 43,63% (erro-padrão=15,47%) (**Figura 14**).

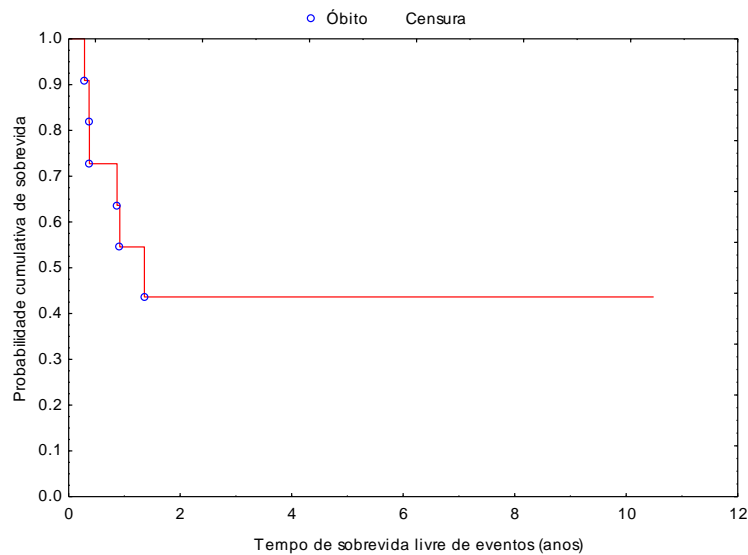


Figura 14 – Sobrevida Livre de eventos dos pacientes que fizeram uso exclusivo de Anti CD20.

5 DISCUSSÃO

Vários estudos retrospectivos e alguns prospectivos têm demonstrado que o Anti CD20 é efetivo na DLPT CD20 positiva, podendo oferecer RC e potencial cura. Comparado a QTC mostra uma taxa de resposta semelhante, porém significativa redução de toxicidade e mortalidade associada ao tratamento.

O objetivo principal deste estudo consistiu em investigar a aplicabilidade e a eficácia desta droga em pacientes pediátricos com DLPT de células B CD20 positiva pós transplante de órgãos sólidos ou medula óssea.

A tolerância à droga foi excelente, os efeitos colaterais foram raros e observados apenas nos primeiros pacientes, que apresentaram febre e ou calafrios responsivos ao uso de paracetamol e ou difenidramina. Não foram observados síndrome de lise tumoral e ou neutropenia em nenhum paciente. Células plasmocitárias não são CD20 positivas e teoricamente a redução de imunoglobulinas não deveria ser esperada, no entanto, a severa depleção de células B pode acarretar hipogamaglobulinemias e deficiências de IgG e IgM tem sido descritas. Dentre os dezesseis pacientes que receberam Anti CD20, treze desenvolveram IgG ≤ 400 mg% e receberam infusão profilática desta imunoglobulina e apenas um paciente é cronicamente dependente de suplementação (houve um óbito por sepse, três semanas após a infusão da quarta dose de Anti CD20). A hipocalcemia considerada um efeito colateral de menor relevância não foi observada neste estudo. Dentre os dezesseis pacientes que usaram Anti CD20, treze obtiveram resposta entre completa e parcial, perfazendo uma SG de 81,45 % em dois anos, dois foram a óbito, um consequente a rejeição e outro a sepse. Dentre os sete pacientes que não usaram Anti CD20, três obtiveram resposta e cinco (62,5%) evoluíram para óbito por DLPT progressiva (2) e rejeição e ou sepse (3). A SG em dois anos foi de 37,5%, observando-se aqui diferença estatística significativa.

Treze pacientes receberam Anti CD20 isoladamente após a suspensão da IS. Seis haviam sido submetidos a transplante hepático dos quais dois evoluíram para o óbito por rejeição e sepse. Dois transplantados de coração e um transplantado de medula óssea obtiveram boa resposta. Dentre quatro transplantados de rim, um evoluiu para óbito por sepse. Estes resultados sugerem que o Anti CD20,

independentemente do órgão transplantado e do tipo histológico de DLPT, é uma excelente opção terapêutica mesmo naqueles pacientes com doença avançada, tardia ou precoce e que tenham apresentado recidivas após o uso anterior desta droga.

O Anti CD20 pode ser considerado como a primeira alternativa de tratamento na DLPT polimórfica após TOS refratária à redução da IS e os resultados dos estudos sugerem que sua utilização na doença monomórfica, apesar de ainda em investigação, permanece entre as opções terapêuticas mais eficientes.

Dentre os treze pacientes com doença monomórfica que usaram Anti CD20, somente dois (16,67%) evoluíram para o óbito. Dentre cinco pacientes com doença polimórfica, três fizeram uso de Anti CD20, dois obtiveram RC e um evoluiu para óbito. Entre dois que não receberam a droga, um foi a óbito. A abordagem inicial, embora controversa, consiste na redução da IS com ou sem Anti CD20 e a QTC tem sido frequentemente utilizada nos pacientes com LNH difuso e Linfoma de Hodgkin.

A manifestação de DLPT com subtipo histológico Linfoma de Burkitt (LB) é considerada de mau prognóstico e é reportada mais frequentemente após transplante cardíaco. Dentre os 6 pacientes (5LB e 1 Burkitt-like) desta casuística que apresentaram LB, quatro (66,67%) eram transplantados de coração e dois (33,33%) de fígado. Três apresentaram RC e três faleceram, um por doença progressiva e dois por rejeição crônica. Torna-se relevante identificar esta neoplasia desde o início dos sinais e sintomas, uma vez que se comporta agressivamente e, de modo usual, não é afetada, por alterações na IS, requerendo a instituição de QTC precocemente ⁽⁷⁷⁾. Os três pacientes que obtiveram remissão receberam QTC isolada (1) e associada ao Anti CD20 (2).

A análise molecular destes tumores, incluindo Microarray permitirá uma melhor compreensão sobre o comportamento biológico destas neoplasias ⁽⁷⁸⁾ e o maior desafio será definir, antes do tratamento, quem são os pacientes que responderão a redução do IS, evitando a utilização inadequada desta modalidade terapêutica em pacientes que não responderão satisfatoriamente.

O risco de desenvolver DLPT é maior durante os primeiros três anos pós TOS, alcançando um pico em seis meses e diminuindo progressivamente, porém, na

quase totalidade dos estudos ainda não se observou incidência zero; conseqüentemente é esperado que esse número aumente na medida em que mais crianças sobrevivam e por mais tempo. Seria crucial no seguimento desses pacientes a verificação periódica dos índices de replicação do EBV. Este era o desejo incluído no desenho básico deste programa, todavia, por razões operacionais, sua realização não foi viável.

Várias publicações descrevem o uso do Anti CD20 na DLPT precoce, porém sua eficácia tem sido igualmente observada na doença tardia. Dotti e colaboradores apresentaram uma série de cinco pacientes com DLPT CD20 positiva, desenvolvida em um período maior que dois anos após o TOS, tratados com Anti CD20, cirurgia e radioterapia, em que dois obtiveram resposta clínica parcial e três respostas completas ⁽⁵⁵⁾. Neste estudo, onze (47,83%) pacientes apresentaram DLPT durante os primeiros dois anos pós TOS, considerada precoce e doze (52,17%) pacientes após este período com SG em dois anos de 68,42% e 60, 57%, respectivamente ao uso de Anti CD20, não tendo sido observado diferença estatística significativa.

Estes resultados nos induzem a considerar o Anti CD20 como uma droga efetiva no tratamento da DLPT pós TOS. O desenho retrospectivo deste estudo e a utilização simultânea de várias medidas terapêuticas não permite detectar a superioridade de uma conduta sobre as outras.

Ensaio clínico prospectivos randomizados serão necessários para melhor definição do papel desta droga no tratamento da doença monomórfica.

A redução e/ou suspensão da IS combinada à estreita vigilância do enxerto, visando detectar precocemente a rejeição de rebote, é a estratégia inicial mais apropriada na doença polimórfica. Esta conduta permitiria a reconstituição parcial da imunidade de células T, promovendo resposta imune Anti EBV e inclusive, protegendo contra outras comorbidades, como o CMV. O momento propício para a reintrodução da IS, idealmente, deveria ser guiado por técnicas de laboratório atuais, que aliadas a CV-EBV, permitem a detecção de rejeição, mesmo antes da resolução completa da DLPT. A redução rápida da CV-EBV e a monitorização da reconstituição das células T EBV específicas por *Enzyme-Linked Immuno Spot* (ELISPOT) e técnicas relacionadas, ainda limitada a laboratórios de pesquisa, são propostas futuras ⁽⁷⁸⁾.

Neste estudo, apesar da sobrevida global (SG) em cinco anos de 65,47%, sete pacientes (30,43%) evoluíram para o óbito, sendo dois deles consequentes a rejeição, reforçando que, tão nociva quanto a DLPT progressiva é a rejeição ao enxerto pós alteração da IS, que pode levar a perda do órgão transplantado e, eventualmente, do paciente.

Perspectivas futuras deverão focar não só em terapias mais potentes, como também em estratégias de proteção ao enxerto. O maior desafio é definir antes do tratamento, quem são os pacientes que responderão à redução da IS, evitando assim a utilização inadequada, durante um período prolongado, desta modalidade terapêutica. A análise molecular destes tumores, incluindo Microarray, poderá permitir uma melhor compreensão sobre o comportamento biológico destas neoplasias.

Torna-se aqui complexo avaliar o papel dos imunossupressores na indução da DLPT, uma vez que, além da multiplicidade de combinações de drogas, os pacientes desta casuística não estavam vinculados a um protocolo pré estabelecido e portanto, sujeitos às modificações do esquema de imunossupressão conforme a resposta clínica e os benefícios apresentados pelas novas drogas que foram sendo introduzidas no mercado no decorrer do estudo. Embora os anticorpos anti linfócito T, como o OKT3, estejam associados a maior ocorrência de DLPT, este aspecto não foi aqui avaliado devido a grande variabilidade de agentes indutórios utilizados nos diferentes transplantes.

A detecção do genoma de EBV na forma latente em tecidos tumorais através da hibridização *in situ* (HIS) é considerada problemática, uma vez que a infecção latente está associada a um número reduzido de cópias de genoma viral além da expressão limitada de RNA. A exceção a esta regra de expressão limitada de RNA são os transcritos de EBER (Epstein Barr Early RNAs) que estão presentes em abundância, tem sua função desconhecida, mas sua utilidade na detecção da infecção na forma latente é bem estabelecida ⁽⁷⁹⁾. A sensibilidade e especificidade desta técnica tornam-na ideal para a detecção da forma latente de EBV em tecido tumoral, porém faz-se necessário advertir que sua interpretação requer acurada habilidade técnica, uma vez que pode se apresentar positiva em casos de rejeição ao enxerto, particularmente na rejeição aguda, rica em células plasmáticas ⁽⁸⁰⁾.

No presente estudo a técnica utilizada para a detecção da proteína de latência viral LMP1 nos vinte e três pacientes foi a imunistoquímica. A LMP1 parece ter importante participação na transativação de uma ampla variedade de genes celulares que podem estar envolvidos na transformação das células B induzidas pelo EBV⁽⁸¹⁾.

Apesar desta série ser representativa do tema, especialmente quando comparada às reportadas na literatura, o número de pacientes incluído é relativamente pequeno para permitir estudo estatístico visando, por exemplo, caracterizar em análise multivariada a relevância de um ou outro fator. Optamos, desta forma, por não proceder esta análise, cientes de que, mesmo que fosse viável, sua representatividade biológica seria limitada.

6 CONCLUSÕES

As taxas de SG e SLE dos 23 pacientes estudados estão de acordo com as estimativas atuais de sobrevida de relatos internacionais da última década. A SG em dois anos de 81,45% observada nos dezesseis pacientes que fizeram uso do Anti CD20 quando comparada a SG de 37,5% dos sete pacientes que não fizeram uso do mesmo mostra diferença estatística significativa (teste log-rank: $p=0,02$) sugerindo fortemente que o uso do Anti CD20 após a redução da IS em DLPT de células B CD20 positiva pós TOS é seguro e eficiente. Da mesma forma quando utilizado nos treze pacientes com doença monomórfica, a SG revelou diferença estatística significativa quando comparada aos seis pacientes que não receberam esta droga. A curta duração deste tratamento de toxicidade aceitável em relação às demais alternativas terapêuticas, a possibilidade de seu uso exclusivo, sua eficácia, inclusive na doença de histologia agressiva e associação às demais alternativas de tratamento na doença refratária, torna esta droga necessária ao arsenal terapêutico atualmente disponível.

Em estudos futuros será relevante determinar que tipo de DLPT deverá ser abordada inicialmente com redução da imunossupressão (RI) isolada, RI + Anti CD20 ou RI + Anti CD20 + QTC, associados ou não aos antivirais, além de outras modalidades de tratamento, que estão sendo desenvolvidas e testadas, dentre elas a imunoterapia adotiva com células T citotóxicas específicas para células B infectadas pelo EBV.

Aproximadamente 80% das DLPT estão associadas ao EBV e em 90% destas o genoma viral pode ser detectado na célula tumoral. Neste estudo todos os vinte e três pacientes tiveram a proteína de latência viral LMP1 detectada no tumor pela técnica de imunoistoquímica corroborando esta associação.

Esta casuística poderá contribuir, de forma pioneira em nosso meio, para o planejamento de estudos clínicos prospectivos randomizados.

Finalizando portanto:

Conclusão 1, correspondendo ao objetivo 1: o anticorpo Anti CD20 é recurso eficiente e potencialmente passível de uso isolado para o tratamento das DLPT.

Conclusão 2, correspondendo ao objetivo 2: embora este estudo seja, de fato, sugestivo de que a resposta terapêutica ao uso do Anti CD20 associe-se à presença do genoma viral (EBV) incorporado, a universalidade desta presença na série analisada não permite definitivamente esta associação.

REFERÊNCIAS

1. Gross TG, Savoldo B, Punnett A. Posttransplant lymphoproliferative diseases. *Pediatr Clin North Am* 2010 Apr;57(2):481-503, table of contents.
2. Penn I. Tumors after renal and cardiac transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993 Apr;7(2):431-45.
3. Mucha K, Foronczewicz B, Ziarkiewicz-Wroblewska B, Krawczyk M, Lerut J, Paczek L. Post-transplant lymphoproliferative disorder in view of the new WHO classification: a more rational approach to a protean disease? *Nephrol Dial Transplant* 2010 Jul;25(7):2089-98.
4. Green M, Michaels MG. Epstein-Barr virus infection and posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant* 2013 Feb;13 Suppl 3:41-54; quiz
5. Sarmiento JM, Dockrell DH, Schwab TR, Munn SR, Paya CV. Mycophenolate mofetil increases cytomegalovirus invasive organ disease in renal transplant patients. *Clin Transplant* 2000 Apr;14(2):136-8.
6. Kirk AD, Cherikh WS, Ring M, Burke G, Kaufman D, Knechtle SJ, et al. Dissociation of depletion induction and posttransplant lymphoproliferative disease in kidney recipients treated with alemtuzumab. *Am J Transplant* 2007 Nov;7(11):2619-25.
7. Jagadeesh D, Woda BA, Draper J, Evens AM. Post transplant lymphoproliferative disorders: risk, classification, and therapeutic recommendations. *Curr Treat Options Oncol* 2003 Mar;13(1):122-36.
8. Tsai DE, Hardy CL, Tomaszewski JE, Kotloff RM, Oltoff KM, Somer BG, et al. Reduction in immunosuppression as initial therapy for posttransplant lymphoproliferative disorder: analysis of prognostic variables and long-term follow-up of 42 adult patients. *Transplantation* 2001 Apr 27;71(8):1076-88.
9. Green M, Webber S. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Pediatr Clin North Am* 2003 Dec;50(6):1471-91.
10. Oertel SH, Verschuuren E, Reinke P, Zeidler K, Papp-Vary M, Babel N, et al. Effect of anti-CD 20 antibody rituximab in patients with post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). *Am J Transplant* 2005 Dec;5(12):2901-6.
11. Ramos E, Hernandez F, Andres A, Martinez-Ojinaga E, Molina M, Sarria J, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders and other malignancies after pediatric intestinal transplantation: incidence, clinical features and outcome. *Pediatr Transplant* 2013 Aug;17(5):472-8.
12. von Falck C, Maecker B, Schirg E, Boerner AR, Knapp WH, Klein C, et al. Post transplant lymphoproliferative disease in pediatric solid organ transplant patients: a possible role for [18F]-FDG-PET(/CT) in initial staging and therapy monitoring. *Eur J Radiol* 2007 Sep;63(3):427-35.
13. Greenfield HM, Gharib MI, Turner AJ, Guiver M, Carr T, Will AM, et al. The impact of monitoring Epstein-Barr virus PCR in paediatric bone marrow transplant patients: can it successfully predict outcome and guide intervention? *Pediatr Blood Cancer* 2006 Aug;47(2):200-5.
14. Manez R, Breinig MC, Linden P, Wilson J, Torre-Cisneros J, Kusne S, et al. Posttransplant lymphoproliferative disease in primary Epstein-Barr virus infection after liver transplantation: the role of cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 1997 Dec;176(6):1462-7.

15. Bakker NA, van Imhoff GW, Verschuuren EA, van Son WJ, van der Heide JJ, Lems SP, et al. HLA antigens and post renal transplant lymphoproliferative disease: HLA-B matching is critical. *Transplantation* 2005 Sep 15;80(5):595-9.
16. Babel N, Vergopoulos A, Trappe RU, Oertel S, Hammer MH, Karaivanov S, et al. Evidence for genetic susceptibility towards development of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ recipients. *Transplantation* 2007 Aug 15;84(3):387-91.
17. Holmes RD, Sokol RJ. Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* 2002 Dec;6(6):456-64.
18. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004 Feb;4(2):222-30.
19. Younes BS, Ament ME, McDiarmid SV, Martin MG, Vargas JH. The involvement of the gastrointestinal tract in posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999 Apr;28(4):380-5.
20. Henry DD, Hunger SP, Braylan RC, Dharnidharka VR. Low viral load post-transplant lymphoproliferative disease localized within the tongue. *Transpl Infect Dis* 2008 Dec;10(6):426-30.
21. Tsao L, Hsi ED. The clinicopathologic spectrum of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Pathol Lab Med* 2007 Aug;131(8):1209-18.
22. Hamilton-Dutoit SJ, Pallesen G. Detection of Epstein-Barr virus small RNAs in routine paraffin sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridization. *Histopathology* 1994 Aug;25(2):101-11.
23. Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Sakamoto K, Purtilo DT, Balfour HH, Jr., et al. Epstein-Barr virus-induced B-cell lymphoma after renal transplantation: acyclovir therapy and transition from polyclonal to monoclonal B-cell proliferation. *N Engl J Med* 1982 Apr 15;306(15):913-8.
24. Smets F, Sokal EM. Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation in children after liver transplant: role of immunity, diagnosis, and management. *Pediatr Transplant* 2002 Aug;6(4):280-7.
25. Starzl TE, Nalesnik MA, Porter KA, Ho M, Iwatsuki S, Griffith BP, et al. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet* 1984 Mar 17;1(8377):583-7.
26. Shapiro RS, McClain K, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Kersey JH, Blazar BR, et al. Epstein-Barr virus associated B cell lymphoproliferative disorders following bone marrow transplantation. *Blood* 1988 May;71(5):1234-43.
27. Young L, Alfieri C, Hennessy K, Evans H, O'Hara C, Anderson KC, et al. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 1989 Oct 19;321(16):1080-5.
28. Swerdlow AJ, Schoemaker MJ, Higgins CD, Wright AF, Jacobs PA. Cancer risk in patients with constitutional chromosome deletions: a nationwide British cohort study. *Br J Cancer* 2008 Jun 17;98(12):1929-33.
29. Swerdlow SH, Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours 2008.
30. Djokic M, Le Beau MM, Swinnen LJ, Smith SM, Rubin CM, Anastasi J, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder subtypes correlate with different recurring chromosomal abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 2006 Mar;45(3):313-8.
31. Yang J, Tao Q, Flinn IW, Murray PG, Post LE, Ma H, et al. Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with posttransplantation

lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood* 2000 Dec 15;96(13):4055-63.

32. Stevens SJ, Pronk I, Middeldorp JM. Toward standardization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated whole blood as preferred clinical specimen. *J Clin Microbiol* 2001 Apr;39(4):1211-6.

33. Bingler MA, Feingold B, Miller SA, Quivers E, Michaels MG, Green M, et al. Chronic high Epstein-Barr viral load state and risk for late-onset posttransplant lymphoproliferative disease/lymphoma in children. *Am J Transplant* 2008 Feb;8(2):442-5.

34. Lau AH, Soltys K, Sindhi RK, Bond G, Mazariegos GV, Green M. Chronic high Epstein-Barr viral load carriage in pediatric small bowel transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2010 Jun;14(4):549-53.

35. Oertel S, Trappe RU, Zeidler K, Babel N, Reinke P, Hummel M, et al. Epstein-Barr viral load in whole blood of adults with posttransplant lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation does not correlate with clinical course. *Ann Hematol* 2006 Jul;85(7):478-84.

36. Green M, Bueno J, Rowe D, Mazariegos G, Qu L, Abu-Elmagd K, et al. Predictive negative value of persistent low Epstein-Barr virus viral load after intestinal transplantation in children. *Transplantation* 2000 Aug 27;70(4):593-6.

37. Green M, Webber SA. EBV viral load monitoring: unanswered questions. *Am J Transplant* 2002 Nov;2(10):894-5.

38. Doak PB, Montgomerie JZ, North JD, Smith F. Reticulum cell sarcoma after renal homotransplantation and azathioprine and prednisone therapy. *Br Med J* 1968 Dec 21;4(5633):746-8.

39. Penn I, Hammond W, Brettschneider L, Starzl TE. Malignant lymphomas in transplantation patients. *Transplant Proc* 1969 Mar;1(1):106-12.

40. Ghobrial IM, Habermann TM, Ristow KM, Ansell SM, Macon W, Geyer SM, et al. Prognostic factors in patients with post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) in the rituximab era. *Leuk Lymphoma* 2005 Feb;46(2):191-6.

41. Evens AM, Roy R, Sterrenberg D, Moll MZ, Chadburn A, Gordon LI. Post-transplantation lymphoproliferative disorders: diagnosis, prognosis, and current approaches to therapy. *Curr Oncol Rep* 2010 Nov;12(6):383-94.

42. Lee JJ, Lam MS, Rosenberg A. Role of chemotherapy and rituximab for treatment of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplantation. *Ann Pharmacother* 2007 Oct;41(10):1648-59.

43. Elstrom RL, Andreadis C, Aqui NA, Ahya VN, Bloom RD, Brozena SC, et al. Treatment of PTLT with rituximab or chemotherapy. *Am J Transplant* 2006 Mar;6(3):569-76.

44. Choquet S, Oertel S, LeBlond V, Riess H, Varoqueaux N, Dorken B, et al. Rituximab in the management of post-transplantation lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation: proceed with caution. *Ann Hematol* 2007 Aug;86(8):599-607.

45. Nakanishi C, Kawagishi N, Sekiguchi S, Akamatsu Y, Sato K, Miyagi S, et al. Post-transplantation lymphoproliferative disorder in living-donor liver transplantation: a single-center experience. *Surg Today* 2012 Aug;42(8):741-51.

46. Leblond V, Dhedin N, Mamzer Bruneel MF, Choquet S, Hermine O, Porcher R, et al. Identification of prognostic factors in 61 patients with posttransplantation lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol* 2001 Feb 1;19(3):772-8.

47. Gross TG, Bucuvalas JC, Park JR, Greiner TC, Hinrich SH, Kaufman SS, et al. Low-dose chemotherapy for Epstein-Barr virus-positive post-transplantation

lymphoproliferative disease in children after solid organ transplantation. *J Clin Oncol*2005 Sep 20;23(27):6481-8.

48. Svoboda J, Kotloff R, Tsai DE. Management of patients with post-transplant lymphoproliferative disorder: the role of rituximab. *Transpl Int*2006 Apr;19(4):259-69.

49. Benkerrou M, Jais JP, Leblond V, Durandy A, Sutton L, Bordignon P, et al. Anti-B-cell monoclonal antibody treatment of severe posttransplant B-lymphoproliferative disorder: prognostic factors and long-term outcome. *Blood*1998 Nov 1;92(9):3137-47.

50. Faye A, Quartier P, Reguerre Y, Lutz P, Carret AS, Dehee A, et al. Chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in post-transplant B-lymphoproliferative disorder following stem cell transplantation in children. *Br J Haematol*2001 Oct;115(1):112-8.

51. Blaes AH, Peterson BA, Bartlett N, Dunn DL, Morrison VA. Rituximab therapy is effective for posttransplant lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation: results of a phase II trial. *Cancer*2005 Oct 15;104(8):1661-7.

52. Faye A, Van Den Abeele T, Peuchmaur M, Mathieu-Boue A, Vilmer E. Anti-CD20 monoclonal antibody for post-transplant lymphoproliferative disorders. *Lancet*1998 Oct 17;352(9136):1285.

53. Cook RC, Connors JM, Gascoyne RD, Fradet G, Levy RD. Treatment of post-transplant lymphoproliferative disease with rituximab monoclonal antibody after lung transplantation. *Lancet*1999 Nov 13;354(9191):1698-9.

54. Choquet S, Leblond V, Herbrecht R, Socie G, Stoppa AM, Vandenberghe P, et al. Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood*2006 Apr 15;107(8):3053-7.

55. Dotti G, Rambaldi A, Fiocchi R, Motta T, Torre G, Viero P, et al. Anti-CD20 antibody (rituximab) administration in patients with late occurring lymphomas after solid organ transplant. *Haematologica*2001 Jun;86(6):618-23.

56. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*1994 Sep;15(9):450-4.

57. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*1998 Aug;16(8):2825-33.

58. Gonzalez-Barca E, Domingo-Domenech E, Capote FJ, Gomez-Codina J, Salar A, Bailen A, et al. Prospective phase II trial of extended treatment with rituximab in patients with B-cell post-transplant lymphoproliferative disease. *Haematologica*2007 Nov;92(11):1489-94.

59. Webber S, Harmon W, Faro A, Green M, Sarwal M, Hayashi R, et al. Anti-CD20 Monoclonal Antibody (rituximab) for Refractory PTLN after Pediatric Solid Organ Transplantation: Multicenter Experience from a Registry and from a Prospective Clinical Trial. *ASH Annual Meeting Abstracts*2004 November 16, 2004;104(11):746-.

60. Mansour AA, 3rd, Watson JT, Martus JE. Displaced dorsal metaphyseal cortex associated with delayed extensor pollicis longus tendon entrapment in a pediatric Smith's fracture. *J Surg Orthop Adv Summer*;22(2):173-5.

61. Aull MJ, Buell JF, Trofe J, First MR, Alloway RR, Hanaway MJ, et al. Experience with 274 cardiac transplant recipients with posttransplant lymphoproliferative disorder: a report from the Israel Penn International Transplant Tumor Registry. *Transplantation*2004 Dec 15;78(11):1676-82.

62. Nalesnik MA. The diverse pathology of post-transplant lymphoproliferative disorders: the importance of a standardized approach. *Transpl Infect Dis* 2001 Jun;3(2):88-96.
63. Harris NL, Ferry JA, Swerdlow SH. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Workshop. *Semin Diagn Pathol* 1997 Feb;14(1):8-14.
64. Sturm-O'Brien AK, Hicks MJ, Giannoni CM, Sulek M, Friedman EM. Tonsillectomy in post-transplant lymphoproliferative disease in children. *Laryngoscope* 2010 Mar;120(3):608-11.
65. Dharnidharka VR, Green M, Webber SA. *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders*. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer; 2010.
66. Davis CL, Harrison KL, McVicar JP, Forg PJ, Bronner MP, Marsh CL. Antiviral prophylaxis and the Epstein Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clin Transplant* 1995 Feb;9(1):53-9.
67. Perrine SP, Hermine O, Small T, Suarez F, O'Reilly R, Boulad F, et al. A phase 1/2 trial of arginine butyrate and ganciclovir in patients with Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies. *Blood* 2007 Mar 15;109(6):2571-8.
68. Green M, Reyes J, Webber S, Rowe D. The role of antiviral and immunoglobulin therapy in the prevention of Epstein-Barr virus infection and post-transplant lymphoproliferative disease following solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis* 2001 Jun;3(2):97-103.
69. Haddad E, Paczesny S, Leblond V, Seigneurin JM, Stern M, Achkar A, et al. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood* 2001 Mar 15;97(6):1590-7.
70. McDiarmid SV, Jordan S, Kim GS, Toyoda M, Goss JA, Vargas JH, et al. Prevention and preemptive therapy of postransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver recipients. *Transplantation* 1998 Dec 27;66(12):1604-11.
71. Haque T, Wilkie GM, Jones MM, Higgins CD, Urquhart G, Wingate P, et al. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive postransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 2007 Aug 15;110(4):1123-31.
72. Brewin J, Mancao C, Straathof K, Karlsson H, Samarasinghe S, Amrolia PJ, et al. Generation of EBV-specific cytotoxic T cells that are resistant to calcineurin inhibitors for the treatment of postransplantation lymphoproliferative disease. *Blood* 2009 Nov 26;114(23):4792-803.
73. De Angelis B, Dotti G, Quintarelli C, Huye LE, Zhang L, Zhang M, et al. Generation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes resistant to the immunosuppressive drug tacrolimus (FK506). *Blood* 2009 Nov 26;114(23):4784-91.
74. Frizzera G, Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ, Rosai J, McKenna RW, Sibley RK, et al. Polymorphic diffuse B-cell hyperplasias and lymphomas in renal transplant recipients. *Cancer Res* 1981 Nov;41(11 Pt 1):4262-79.
75. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A, Frizzera G, Chen J, Rose EA, et al. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of postransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 1995 Jan 15;85(2):552-65.
76. Murphy SB, Fairclough DL, Hutchison RE, Berard CW. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood: an analysis of the histology, staging, and response to treatment of 338 cases at a single institution. *J Clin Oncol* 1989 Feb;7(2):186-93.

77. Smets F, Vajro P, Cornu G, Reding R, Otte JB, Sokal E. Indications and results of chemotherapy in children with posttransplant lymphoproliferative disease after liver transplantation. *Transplantation*2000 Mar 15;69(5):982-4.
78. Webber SA, Naftel DC, Fricker FJ, Olesnevich P, Blume ED, Addonizio L, et al. Lymphoproliferative disorders after paediatric heart transplantation: a multi-institutional study. *Lancet*2006 Jan 21;367(9506):233-9.
79. Barletta JM, Kingma DW, Ling Y, Charache P, Mann RB, Ambinder RF. Rapid in situ hybridization for the diagnosis of latent Epstein-Barr virus infection. *Mol Cell Probes*1993 Apr;7(2):105-9.
80. Koike J, Yamaguchi Y, Hoshikawa M, Takahashi H, Horita S, Tanabe K, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorders in kidney transplantation: histological and molecular genetic assessment. *Clin Transplant*2002;16 Suppl 8:12-7.
81. Nakagomi H, Dolcetti R, Bejarano MT, Pisa P, Kiessling R, Masucci MG. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*1994 Apr 15;57(2):240-4.