Paula Yurie Tanaka

Detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV), expressão de FOXP3 e avaliação da carga viral para EBV como marcadores prognósticos nos linfomas relacionados à Aids

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de título de
Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Pereira

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tanaka, Paula Yurie

Detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV), expressão de FOXP3 e avaliação da carga viral para EBV como marcadores prognósticos nos linfomas relacionados à AIDS / Paula Yurie Tanaka. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientadora: Juliana Pereira.

Descritores: 1.HIV 2.Síndrome de imunodeficiência adquirida 3.Linfoma relacionado a AIDS 4.Terapia anti-retroviral de alta atividade 5.Vírus Epstein-Barr

USP/FM/DBD-259/12

Dedicatória

Este trabalho é dedicado aos pacientes portadores de linfomas relacionados à Aids.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Juliana Pereira, pela orientação e estímulo constante à produção científica, auxílio inestimável para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ester Cerdeira Sabino, pela colaboração e por disponibilizar o Laboratório de biologia tumoral para que este trabalho pudesse ser realizado.

À Suzete Cleusa Ferreira e Anna Shoko Nishiya, pela paciência e assistência na realização da carga viral do vírus de Epstein-Barr.

Ao Prof. Dr. Kouichi Ohshima, pela colaboração na realização e interpretação dos métodos de imuno-histoquímica e hibridização *in situ*.

“A resposta certa, não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”

(Mario Quintana)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. Introdução	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão da literatura.....	4
3.1 Linfomas relacionados à Aids.....	4
3.2 Vírus de Epstein-Barr.....	9
3.3 Carga viral do vírus de Epstein-Barr e linfomas em pacientes imunossuprimidos.....	18
3.4 FOXP3 e doença linfoproliferativa.....	21
4. Métodos.....	25
5. Resultados.....	32
6. Discussão.....	39
7. Conclusões.....	45
Anexos.....	46
8. Referências.....	53

Lista de siglas

ACV	Antígeno capsídeo Viral
Aids	Acquired Immunodeficiency Virus Syndrome
ARL	AIDS-related lymphoma
CCR-5	Chemokine receptor 5
CHOP	Ciclofosfamida, Doxorrubicina, Vincristina e Prednisona
COHERE	Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Group
CV	Carga Viral
DAB	Diaminobenzidina
DLPT	Doença Linfoproliferativa pós-transplante
DNA	Deoxyribonucleic acid
EBER	Epstein-Barr virus–encoded small RNA
EBER(+)	EBER positive
EBER(-)	EBER negative
EBNA-LP	Epstein-Barr nuclear antigen Leader Protein
EBNA1	Epstein-Barr nuclear antigen 1
EBNA2	Epstein-Barr nuclear antigen 2
EBNA3A	Epstein-Barr nuclear antigen 3A
EBNA3B	Epstein-Barr nuclear antigen 3B
EBNA3C	Epstein-Barr nuclear antigen 3C
EBV	Epstein-Barr Virus
FOXP3	Forkhead box P3 gene
FOXP3	Forkhead box P3 protein
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV	Human Immunodeficiency Vírus
HTLVIII/LAV	Human T-Lymphotropic Virus Type III/ Lymphadenopathy-Associated Virus
ICE	Ifosfamida, Carboplatina, Etoposídeo
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IH	Imuno-histoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IPEX	Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked Syndrome
ISH	In Situ Hybridization
LB	Linfoma de Burkitt
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDGCB	Linfoma Difuso de Grandes Células B
LH	Linfoma de Hodgkin
LMP-1	Latent Membrane Protein 1

LMP-2A	Latent Membrane Protein 2A
LMP-2B	Latent Membrane Protein 2B
LNH	Linfoma não-Hodgkin
LP	Linfoma Plasmoblástico
LPE	Linfoma Primário de Efusões
LPSNC	Linfoma Primário de Sistema Nervoso Central
NCI	National Cancer Institute
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNA	Peptide Nucleic Acid
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
RC	Resposta Completa
RNA	Ribonucleic Acid
RNAm	RNA mensageiro
RP	Resposta parcial
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SLF	Sobrevida Livre de Falha
SNC	Sistema Nervoso Central
Th	Célula T helper
Treg	Célula T regulatória

Lista de tabelas

Tabela 1 - Tipos de latência na infecção pelo EBV.....	14
Tabela 2 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes.....	35

Lista de figuras

Figura 1 - Infecção pelo EBV em indivíduos saudáveis.....	13
Figura 2 - Cinética dos anticorpos específicos contra EBV e carga viral para EBV na mononucleose infecciosa.....	16
Figura 3 - Evolução dos pacientes incluídos no estudo.....	36
Figura 4 - Carga viral para EBV (plasma e PBMC) em pacientes com ARL em remissão completa.....	37
Figura 5 - Sobrevida global dos pacientes com ARL.....	38

Resumo

Tanaka PY. Detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV), expressão de FOXP3 e avaliação da carga viral para EBV como marcadores prognósticos nos linfomas relacionados à Aids

[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: Pacientes com infecção pelo HIV têm risco aumentado para o desenvolvimento de linfomas não-Hodgkin de células B comparado à população geral. Dentre os mecanismos que podem estar relacionados a esta patologia, encontra-se a reativação do vírus de Epstein-Barr secundária a imunossupressão. O papel do sistema imune para desenvolvimento de tumores é citado há longa data, e seu equilíbrio é mantido pelos linfócitos T regulatórios, cujo principal regulador e marcador é o fator de transcrição FOXP3. Neste estudo, avaliamos a presença de EBER e FOXP3 em amostras diagnósticas, além da carga viral para o vírus de Epstein-Barr em pacientes com linfomas relacionados à Aids a fim de avaliar e correlacionar os resultados como marcadores prognósticos nesta população. **Métodos:** Análise prospectiva da carga viral para Epstein-Barr no plasma e em células mononucleares do sangue periférico em 15 pacientes com linfomas relacionados à Aids acompanhados no Serviço de Hematologia do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e do Hospital das Clínicas/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As mensurações foram realizadas para cada paciente por reação da cadeia de polimerase em tempo real ao diagnóstico, término do tratamento e três meses após o término do tratamento. Dois grupos controles constituídos de 26 pacientes infectados pelo HIV em uso de anti-retroviral e sem diagnóstico de linfoma ou infecção oportunista e 30 indivíduos saudáveis também foram analisados para comparação da carga viral para o vírus de Epstein-Barr. Amostras coletadas por biópsia para o diagnóstico de linfoma foram submetidas a análise imuno-histoquímica para FOXP3 e para EBER por hibridização *in situ*. **Resultados:** 13 pacientes eram do sexo masculino e dois do sexo feminino, dos quais 14 foram tratados com quimioterapia e um com radioterapia de sistema nervoso central. Nove de 15 pacientes (60%) completaram o tratamento proposto e obtiveram remissão completa. A mediana da carga viral para o vírus de Epstein-Barr antes do tratamento foi 13 cópias/ 10^6 nas células mononucleares do sangue periférico (1-1472 cópias/ 10^6) e 70 cópias/mL (0-24900 cópias/mL) no plasma. Após o tratamento foi de 0,5/ 10^6 (0-109,5) e indetectável no plasma, com diminuição significativa da carga viral em células mononucleares do sangue periférico ($p=0,022$) e no plasma ($p=0,003$) ao término do tratamento em comparação ao diagnóstico. Nos pacientes em remissão completa, a carga viral para o vírus de Epstein-Barr diminuiu tanto no plasma como em células

mononucleares do sangue periférico na maioria dos casos. A hibridização *in situ* para EBER resultou positiva em 7/15 (46,7%) casos, sendo significativamente superior no grupo de pacientes com linfomas relacionados a AIDS com mais de um sítio extralinfonodal comprometido ($p=0,041$) e com linfócitos T CD4 <100 células/ μL ($p=0,026$). A expressão de FOXP3 foi negativa em 15/15 (100%) dos pacientes com ARL. Conclusões: A expressão de EBER foi positiva em 7/15 (46,7%) dos pacientes com linfomas relacionados à Aids e superior de forma significativa nos pacientes com estágio mais avançado do linfoma e maior grau de imunossupressão. Observou-se diminuição estatisticamente significativa da mediana de carga viral para o vírus de Epstein-Barr em células mononucleares do sangue periférico ($p=0,022$) e plasma ($p=0,003$) após o tratamento do linfoma em comparação aos valores do diagnóstico em pacientes que atingiram remissão completa, o que poderia ser considerado um marcador prognóstico de resposta a terapia.

Descritores: HIV, Síndrome da imunodeficiência adquirida, Linfoma relacionado à Aids, Terapia anti-retroviral de alta atividade, Vírus Epstein-Barr

Summary

Tanaka PY. Epstein-Barr virus (EBV) detection, FOXP3 expression and evaluation of EBV viral load as prognostic markers in Aids-related lymphomas. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Introduction: Patients with HIV infection have increased risk for development of non-Hodgkin's lymphoma compared to general population. Among mechanisms that could be related to this disease is the reactivation of Epstein-Barr virus infection secondary to immunosuppression. The role of immune system in development of tumors was reported a long time ago, and balance of this system is maintained by regulatory T cells; FOXP3 transcription factor is the main regulator and marker of these cells. In this study we evaluated the presence of EBER and FOXP3 in diagnostic samples, and also viral load of Epstein-Barr virus in patients with Aids-related lymphoma to evaluate and correlate the results as prognostic markers in this population. Methods: Prospective analysis of viral load of Epstein-Barr virus in plasma and peripheral blood mononuclear cells from 15 patients with Aids-related lymphoma treated at “Instituto de Infectologia Emílio Ribas” and “Hospital das Clínicas/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”. Viral load measures were performed by real time polymerase chain reaction at diagnosis of lymphoma, completion of treatment and three months afterwards. Two control groups composed by 26 HIV-positive patients in use of HAART and without diagnosis of lymphoma or opportunistic infection and 30 healthy persons were also analyzed for viral load comparison. Biopsy samples performed to lymphoma diagnosis were submitted to immunohistochemistry for FOXP3 and in situ hybridization to EBER. Results: 13 patients were male and two females, 14 were treated with chemotherapy and one with radiotherapy of central nervous system. Nine of 15 patients (60%) completed treatment achieving complete remission. Median viral load of Epstein-Barr virus before treatment was 13 copies/ 10^6 in peripheral blood mononuclear cells (1-1472 copies/ 10^6) and 70 copies/mL (0-24900 copies/mL) in plasma. After treatment it was 0,5/ 10^6 (0-109,5) and not detectable in plasma, with significant decrease of viral load in peripheral blood mononuclear cells ($p=0,022$) and in plasma ($p=0,003$) after treatment compared to diagnosis. In patients with complete remission, viral load decreased in the majority of cases. In situ hybridization for EBER was positive in 7/15 (46,7%), and significant higher in the group of patients with Aids-related lymphoma with more than one extra nodal site ($p=0,041$) and CD4 T-cells <100 cells/ μ L ($p=0,026$). FOXP3 expression was

negative in 15/15 (100%) of patients with ARL. Conclusions: EBER expression was positive in 7/15 (46,7%) of patients with Aids-related lymphoma and significantly higher in patients with advanced stages of lymphoma and higher degree of immunosuppression. Significant decrease in median viral load of Epstein-Barr virus was observed in peripheral blood mononuclear cells ($p=0,022$) and plasma ($p=0,003$) after lymphoma treatment compared to diagnosis in patients that achieved complete remission, what could be considered a prognostic marker of response to therapy.

Descriptors: HIV, Acquired immunodeficiency Syndrome, Aids-related lymphoma, Highly active antiretroviral therapy, Epstein-Barr virus.

1. Introdução

Pacientes infectados pelo HIV apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de linfomas comparado a população geral¹. Dentre os mecanismos que podem contribuir para esta neoplasia, encontra-se o vírus de Epstein-Barr (EBV), que infecta principalmente linfócitos B, sabidamente relacionado ao desenvolvimento do Linfoma de Burkitt (LB) endêmico e doença linfoproliferativa pós-transplante².

Nos pacientes com linfomas relacionados à Aids (ARL), o EBV está presente em alguns subtipos destes linfomas, e em quase todos os casos de linfoma primário de sistema nervoso central (LPSNC) que é caracterizado nesta população por pacientes com grau de imunossupressão severa³. Desta forma, acredita-se que a reativação da infecção do EBV em imunossuprimidos poderia contribuir para estímulo na proliferação de linfócitos B a longo prazo, com maior chance da ocorrência de erros genéticos e aparecimento de uma população clonal maligna. Alguns estudos têm sido realizados a fim de elucidar o papel da carga viral (CV) para EBV em pacientes com ARL. Os resultados demonstram, em sua maioria, haver aumento da carga viral para EBV nesta população em relação a indivíduos HIV-negativos^{4,5}. Poucos estudos comparam a CV quantitativa do EBV em diferentes fases da doença (antes e após tratamento do linfoma) a fim de correlacionar a replicação do EBV com a resposta à terapia^{6,7}.

Além disso, o papel do sistema imune no desenvolvimento de tumores é relatado desde a década de 50, pelo conceito de vigilância imunológica que envolve o reconhecimento e destruição de células tumorais pelo sistema imune, cujo equilíbrio é mantido pelos linfócitos T regulatórios (Treg), capazes de suprimir a expansão ou ativação de células T auto-reativas, e sua depleção causa doenças auto-imunes⁸. Estudos mostram que o fator de transcrição codificado pelo gene “forkhead box P3”, denominado FOXP3, está presente em linfócitos Treg sendo o principal regulador e marcador específico destas células que também podem bloquear a resposta imune antitumoral. Trabalhos demonstram a presença das células Treg em tumores sólidos onde a detecção de FOXP3 parece estar relacionada à pior prognóstico⁹. Porém, nas neoplasias linfoproliferativas, estaria relacionada à melhor evolução da doença¹⁰.

No presente estudo, os autores realizaram a avaliação da expressão de FOXP3, EBER (*Epstein-Barr virus–encoded small RNA*) em tecido tumoral de 15 pacientes com ARL e da CV para EBV, a fim de verificar a presença dos mesmos e correlacionar os resultados como marcadores prognósticos neste grupo de pacientes.

2. Objetivos

Gerais:

Avaliar a carga viral do EBV, a expressão de EBER e de FOXP3 em pacientes com linfoma relacionado à Aids.

Específicos:

Correlacionar a presença de EBER e de FOXP3 em tecido tumoral e os valores da carga viral do EBV como marcadores prognósticos em portadores de linfoma relacionado à Aids acompanhados nas Instituições acima descritas.

3. Revisão da literatura

3.1 Linfomas relacionados à Aids

No início da década de 80, Ziegler et al.¹¹, descreveram quatro casos de linfoma não-Hodgkin (LNH) tipo “Burkitt-like” em pacientes homossexuais masculinos. Em dois casos identificou-se a presença do antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr (EBV), propondo-se uma possível correlação entre infecção viral e desenvolvimento de neoplasias. Em 1984, foi publicada análise retrospectiva de 90 casos de LNH de células B entre homossexuais masculinos nos Estados Unidos da América. Observaram-se nesta casuística, características semelhantes às descritas em linfomas encontrados em pacientes com imunodeficiência congênita e/ou iatrogênica induzida por agentes imunossupressores. Assim sugeriu-se que alguns subtipos de LNH poderiam ser considerados manifestação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids)¹². Posteriormente, em 1985, LNH de fenótipo B, à época denominado de linfoma de tipo histopatológico de alto grau (difuso, indiferenciado), em pacientes positivos para HTLVIII/LAV (*Human T-Lymphotropic Virus Type III/ Lymphadenopathy-Associated Virus*), posteriormente denominado de vírus da imunodeficiência humana (HIV), foram reconhecidos como doença definidora de Aids.

O risco relativo de um indivíduo infectado pelo HIV desenvolver LNH é cerca de 100 vezes maior do que o esperado para a população geral. O

LNH é uma doença definidora de Aids em 3 a 5 % dos casos e causa de morte nesta população em 16%. Podem apresentar-se sob forma sistêmica ou como linfoma primário do sistema nervoso central (LPSNC). São usualmente de comportamento agressivo e freqüentemente acometem sítios extralinfonodais ^{1,14}.

Inicialmente os pacientes com linfoma relacionado à Aids foram tratados com esquemas de quimioterapia em dose intensiva, similares aos empregados na terapia de pacientes HIV-negativos. As taxas de mediana de sobrevida global (SG) eram estimadas em 5 meses a 11 meses, com sobrevida livre de doença (SLD) em dois anos de 10% a 20%. A mortalidade ocorria por toxicidade ao esquema quimioterápico utilizado e infecções oportunistas ^{15,16,17}. Um estudo prospectivo, multicêntrico, realizado pela “AIDS Clinical Trials Group” comparando o uso de quimioterapia em dose reduzida e a dose padrão, não evidenciou diferença na SG ou SLD, porém demonstrou menor toxicidade no grupo tratado com doses reduzidas, sugerindo ser esta uma estratégia a ser considerada como escolha para o tratamento dos pacientes com ARL ¹⁸.

Em 1996, a terapia anti-retroviral de alta atividade (HAART) alterou de forma radical a história natural da infecção pelo HIV. Houve aumento substancial da sobrevida dos pacientes associada ao melhor estado imunológico que levou à diminuição dos quadros de infecção oportunista. Concomitante foi possível empregar tratamento quimioterápico com as doses preconizadas para imunocompetentes e conseqüente melhora das taxas de resposta global e de sobrevida dos pacientes ^{1,19}.

A incidência de LNH parece ter diminuído com o uso de HAART, mas em menor grau quando comparado a outras doenças definidoras de Aids. Alguns resultados são controversos, não considerando diferenças individuais tais como acesso à terapia, aderência e resposta ao tratamento. Estudo do grupo “Multicenter AIDS Cohort” mostrou aumento da incidência de LNH entre homens HIV-positivos comparada a HIV-negativos durante a era HAART²⁰. Entretanto, o grupo “EuroSIDA” evidenciou redução da incidência de LNH do período anterior a setembro de 1995 e após março de 1999 de 1,99 casos para 0,30 casos por 100 pessoas/ano²¹.

Besson et al.²², analisando dados do “French Hospital Database on HIV”, observaram que a incidência de ARL sistêmico diminuiu da era pré-HAART (1993 a 1994) de 86 por 10.000 pessoas/ano para 42,9 por 10.000 pessoas/ano na era pós-HAART (1997 a 1998). Porém, esta redução não foi observada quando se comparou pacientes HIV-positivos com níveis similares de linfócitos T CD4 antes e após a introdução de HAART. Observou-se melhor estimativa da SG dos pacientes com LNH sistêmico no período pós HAART.

A base de dados do grupo “Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Group” (COHERE) mostrou incidência de ARL de 205,1 e 462,6 por 100.000 pessoas/ano em pacientes em uso de HAART e sem uso de HAART, respectivamente. Em análise multivariada os fatores predisponentes para o desenvolvimento de ARL foram idade, número de linfócitos T CD4, e a carga viral para HIV em ambos os

grupos. O risco de LNH foi maior em pacientes com linfócitos T CD4 entre 200 a 349 células/ μ L²³. Desta forma, a introdução da HAART pode ser considerada como a melhor medida preventiva para desenvolvimento de ARL.

Os ARL são classificados pela Organização Mundial da Saúde em linfomas habitualmente presentes em imunocompetentes como o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) e linfoma de Burkitt (LB); ou em linfomas usualmente encontrados em indivíduos HIV-positivos como o linfoma primário de efusões (LPE) e o linfoma plasmoblástico (LP). O LPSNC corresponde ao LDGCB variante morfológica imunoblástica³.

Em relação à fisiopatologia do ARL, estudos sugerem a participação de múltiplos fatores dependentes ou não do hospedeiro, do próprio HIV e de infecções secundárias. Determinados genótipos do hospedeiro podem predispor a maior nível de produção de quimiocinas. Estas podem regular a migração de leucócitos para locais de inflamação e infecção e podem estar envolvidas com o aparecimento de doenças, incluindo câncer. Os tumores em geral induzem a produção de quantidades anormalmente altas de quiniocinas ou interferir na expressão e sinalização aberrante de seus receptores. As quimiocinas podem agir diretamente promovendo o crescimento neoplásico, intermediando a migração de leucócitos para o microambiente tumoral ou estimulando a liberação de fatores de crescimento. De forma indireta induz angiogênese²⁴. Na infecção pelo HIV as duas principais quimiocinas implicadas na gênese do LNH são o SDF-1 (*Stromal cell-derived factor 1*) e o receptor de quimiocina 5

(CCR5). O SDF-1 é um potente quimioatrativo de linfócitos B e seus precursores. Apesar de produzido pelas células do estroma da medula óssea, seu RNA mensageiro (RNAm) encontra-se expresso em vários órgãos como coração, fígado, pulmão, cérebro, músculo, baço e rins, refletindo uma provável função na recirculação de linfócitos²⁵. Variações no polimorfismo do gene SDF-1 como o SDF-1-3'A em indivíduos HIV-positivos foi relacionado ao aumento absoluto do risco de desenvolvimento de LNH²⁶.

O CCR-5 é usualmente expresso em linfócitos T em repouso, monócitos, macrófagos, e células dendríticas imaturas. Codifica um receptor de superfície celular para várias quimiocinas dentre as quais “Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted” (RANTES), responsável pela proliferação de linfócitos B. A ativação de linfócitos T CCR5(+) estimula a migração e expansão de linfócitos T²⁷. Estudos “in vitro” demonstraram que o receptor CCR5 é o principal co-receptor para as cepas primárias do HIV que possuem tropismo por macrófagos. Um dos polimorfismos do gene CCR5, denominado CCR5-Δ32, mais freqüentemente encontrado em caucasianos, codifica um receptor não funcional, conferindo proteção contra a progressão para a Aids²⁹.

Rabkin et al.²⁶ analisaram 741 indivíduos HIV-positivos provenientes de três estudos de uma coorte do National Cancer Institute (NCI) e 24 pacientes HIV-negativos com LNH de outros estudos da mesma Instituição. O objetivo do estudo foi avaliar a relação entre a presença dos polimorfismos SDF-1-3'A e CCR5-Δ32 e desenvolvimento de linfoma.

Os portadores de SDF-1-3'A em homozigose e HIV-positivos apresentaram maior risco de desenvolverem LNH em relação aos HIV-positivos heterozigotos para SDF-1-3'A ($p<0.01$). Por outro lado, o polimorfismo CCR5- $\Delta 32$ protegeu os indivíduos HIV-positivos quanto ao desenvolvimento de LNH ($p<0,02$). Outro estudo confirmou este resultado ao demonstrar que pacientes HIV-positivos e heterozigotos para CCR5- $\Delta 32$ apresentaram menor risco para LNH³⁰. Tal efeito protetor pode estar relacionado à menor taxa de replicação do HIV, a ausência de co-infecções virais potencialmente oncogênicas e diminuição da resposta linfocitária B ao estímulo pró-mitótico de RANTES.

Por outro lado, uma das características da infecção pelo HIV é a ativação e estimulação de linfócitos B secundariamente à produção das interleucinas 6 (IL-6) e IL-10. Este efeito pode também contribuir para o crescimento tumoral. Indiretamente esta ativação crônica pode ser comprovada pelas altas concentrações séricas de anticorpos anti-HIV. Assim, a estimulação contínua da proliferação de linfócitos B mediada pelo HIV pode aumentar a probabilidade do desenvolvimento de clone maligno^{31,32,33,34}.

A reativação da infecção pelo EBV também estimula a proliferação de linfócitos B e está associada ao desenvolvimento dos ARL³⁵.

3.2 Vírus de Epstein-Barr

Em 1958, foram descritos casos de câncer em crianças na África equatorial os quais posteriormente foram denominados de LB³⁶. De

comportamento muito agressivo, acometia mais comumente a mandíbula. A localização nesta região geográfica específica levou à suspeição de possível correlação com agente infeccioso³⁷. Em 1964, Epstein et al., observaram em cultura de células do LB células semelhantes a linfoblastos e presença de inclusões citoplasmáticas³⁸. Foram também observadas partículas virais semelhantes às do vírus Herpes simples nas linhagens celulares obtidas do LB. Posteriormente verificou-se tratar-se de outro vírus, o qual foi denominado de EBV³⁹. No final da década de 60 demonstrou-se que pacientes com LB apresentavam altos títulos de anticorpos anti-EBV à semelhança dos portadores de mononucleose infecciosa^{40,41}.

O vírus de Epstein-Barr é um vírus da família *Herpesviridae* com genoma composto de fita dupla de ácido desoxirribonucleico (DNA) e cosmopolita. Transmitido via oral pode ser detectado nas secreções da orofaringe de pacientes com mononucleose infecciosa, em imunocomprometidos e em baixo nível em imunocompetentes⁴².

O EBV infecta inicialmente linfócitos B e células epiteliais. A infecção primária ocorre nas tonsilas e depende da ligação da glicoproteína viral 350/220 (gp350/220) com a molécula de superfície CD21 dos linfócitos B. O EBV pode infectar outras células a exemplo das células epiteliais, mesenquimais e as células T. A infecção pelo EBV pode ocorrer sob as formas lítica ou latente². Os vírus são produzidos na fase lítica e levam a expressão de aproximadamente 80 proteínas virais na fase de replicação. Destas, destacam-se as proteínas ativadoras de transcrição, os fatores

de replicação de DNA, e proteínas estruturais. As proteínas BZLF1 e BRLF1 fazem a interface para a mudança da fase de latência para a fase lítica. A expressão da enzima DNA polimerase se correlaciona com a replicação do DNA viral com posterior formação dos capsídeos virais. Após serem envelopados os novos vírus são liberados pelas células infectadas. Uma das consequências da infecção dos linfócitos B pelo EBV é a ativação da proliferação e a diferenciação destas células rumo à formação de células B de memória^{2,43}. Com o passar do tempo o número de linfócitos B diminui e a detecção torna-se difícil em indivíduos imunocompetentes (Figura 1).

A fase de latência caracteriza-se pela persistência da infecção viral, porém sem replicação viral e capacidade infectiva viral bem restrita. Nesta fase, a expressão do vírus fica restrita às proteínas virais nucleares EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C e EBNA-LP, às proteínas latentes de membrana LMP1, LMP2A e LMP2B e a alguns pequenos RNAs virais EBER1 e EBER2 e os transcritos da região Bam HI². O padrão de expressão gênica de diferentes linhagens celulares de LB e de células linfoblastóides evidencia diferentes tipos de latência (Tabela 1). O linfócito B contendo infecção latente pelo EBV pode eventualmente ser reativado e produzir novos vírus que subsequenteiramente podem reinfectar novos linfócitos B e células epiteliais. Neste modelo os linfócitos B atuam como fonte de transmissão viral, mas os fatores determinantes desta reativação não estão bem elucidados^{2,43}. Na maioria das vezes, a infecção primária pelo EBV provoca sintomas comuns de outras

infecções virais agudas. Em alguns casos, especialmente em crianças abaixo de 10 anos a infecção pode ser assintomática⁴⁴. Nos adolescentes manifesta-se com odinofagia, febre, linfadenomegalia e esplenomegalia. Nesta fase, altos títulos de EBV podem ser detectados no compartimento extracelular a exemplo da cavidade oral e da saliva e indicam presença de nível significativo de replicação viral².

A exposição ao EBV via secreção oral ou sangue é um gatilho para o início da infecção de linfócitos B da cavidade oral e de células epiteliais. A manifestação clínica da mononucleose infecciosa acontece 5 a 7 semanas após o contato. Porém existem poucos dados sobre os eventos virais e imunológicos durante o período de incubação. Nesta fase a carga viral do EBV na cavidade oral é maior do que no sangue e assim permanece por meses. O DNA viral detectado no sangue é em sua maioria originado dos linfócitos B^{43,45}.

Durante o período agudo da mononucleose infecciosa 0,1% a 1% dos linfócitos B do sangue periférico contem EBV com padrão de expressão gênica de latência tipo III. A proliferação destes linfócitos contribui aumentar o número de células infectadas. Os linfócitos B também infiltram tecidos linfóides. Biópsias de linfonodos e tonsilas deste período mostram expansão difusa de imunoblastos na região cortical dos linfonodos². A semelhança dos imunoblastos com as células de Reed-Sternberg do Linfoma de Hodgkin (LH) dificulta a diferenciação entre mononucleose infecciosa e este linfoma à morfologia⁴⁶.

FONTE: Odumade OA et al., 2011. Traduzido por Paula Yurie Tanaka.

Figura 1. Infecção pelo EBV em indivíduos saudáveis. A infecção primária pelo EBV inicia-se na cavidade oral. Nesse local o vírus utiliza diferentes glicoproteínas para infectar células epiteliais e linfócitos B “naive”. A entrada do vírus na célula permite a passagem do genoma viral para o núcleo celular onde a polimerase viral e a polimerase celular promovem a replicação viral. Os produtos genéticos do EBV ativam o programa de crescimento das células B, resultando na proliferação de células linfoblastóides. A ativação de células T ocorre em paralelo. As células linfoblastóides são destruídas pelos linfócitos T citotóxicos e uma vez na circulação, as células B de memória previamente ativadas podem continuar com a replicação viral ou entrar na fase de latência. Posteriormente, como as células circulam novamente entre os compartimentos oral e periférico, células B podem ser ativadas, resultando na reativação viral e replicação.

Tabela 1. Tipos de latência na infecção pelo EBV

Tipo de latência	Expressão gênica
Tipo 0	EBERs, LMP2A
Tipo I	EBERs, EBNA1
Tipo II	EBERs, EBNA1, LMP2A, LMP1
Tipo III	EBERs, EBNA1, LMP2A, LMP1, EBNA2, EBNA3, EBNA-LP

FONTE :Kutok JL et al., 2006. Traduzido por Paula Yurie Tanaka.

Como resposta a infecção do EBV nos linfócitos B ocorre ativação de linfócitos T CD8 os quais podem ser encontrados na forma de linfócitos atípicos no sangue periférico. Nesta fase, há resposta humoral com altos títulos de anticorpos IgM contra o capsídeo viral do EBV e a concomitante soroconversão tardia caracterizada pelo aparecimento de anticorpos contra o antígeno latente EBNA1 (Figura 2)^{2,43}.

Dentre os testes específicos para detectar o EBV encontram-se a imunofluorescência indireta, que distingue infecção aguda, período de convalescença e infecção prévia. Na infecção aguda há anticorpos IgM contra o antígeno do capsídeo viral e ausência de anticorpos IgG contra o antígeno latente EBNA1. Os anticorpos IgG contra o antígeno do capsídeo viral podem estar presentes, mas em menor quantidade do que

IgM. Na convalescença há diminuição dos anticorpos IgM contra antígeno do capsídeo viral e aumento dos anticorpos IgG que podem persistir indefinidamente. O EBV também pode ser identificado em amostras de tecidos por imuno-histoquímica (IH), mas a hibridização “in situ” (ISH) para EBER é o padrão ouro para a detecção tecidual do vírus. O EBER está expresso em todos os tumores associados à infecção pelo EBV, em tecido linfóide de pacientes com mononucleose infecciosa e em raras células de indivíduos saudáveis previamente expostos. A hibridização *in situ* pode ser realizada em amostras de tecido parafinado. Neste caso primeiro deve-se remover a parafina do tecido seguido de tratamento com proteinase K e detergente para que a sonda complementar ao EBV possa entrar no núcleo celular e ligar-se aos transcritos virais. A leitura da reação é feita com visualização microscópica do sinal nuclear do EBER nas células infectadas latentes⁴⁷.

FONTE: Odumade O.A., et al., 2011. Traduzido por Paula Yurie Tanaka. Figura 2. Cinética dos anticorpos específicos contra EBV e carga viral para EBV na mononucleose infecciosa. O gráfico mostra a evolução da replicação do EBV e os anticorpos EBV específicos medidos por ELISA durante a infecção primária. Inicialmente, o EBV pode não ser detectado no sangue periférico, mas geralmente é encontrado em quantidades elevadas na cavidade oral. O vírus desaparece no sangue mais rapidamente do que na cavidade oral. A replicação na cavidade oral pode persistir por meses e recorrer de forma intermitente por anos na maioria dos indivíduos saudáveis. No início da doença, a maioria dos pacientes tem anticorpos IgM para o ACV do EBV; os quais diminuem entre 2 meses a 6 meses após a infecção. Os anticorpos IgG para ACV podem ser detectados precocemente nas duas primeiras semanas. Em quase 100% dos pacientes se detecta anticorpos IgG para ACV durante o período de convalescença, persistindo durante a vida. Anticorpos IgG para EBNA1 não se desenvolvem até 3 meses a 6 meses após a infecção mas persistem por toda a vida.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa é utilizada para avaliar a carga viral do EBV inclusive para monitorar pacientes em risco de desenvolvimento de doenças linfoproliferativas pós-transplante (DLPT). Não há consenso em relação ao valor do PCR nesses pacientes no direcionamento do manuseio dos agentes imunossupressores⁴⁸. Também não existe padronização para a PCR quantitativa para o EBV, nem se deve ser realizada em sangue total ou em plasma. No primeiro caso avalia-se a presença de vírus no compartimento intracelular e no segundo no compartimento extracelular. Alguns autores recomendam realizar PCR para EBV em amostras de plasma, mas a maioria sugere análise de sangue total⁴⁹. O número de cópias virais no plasma é usualmente 10 a 100 vezes inferior à do sangue total⁴³.

Para interpretar os valores da CV do EBV por PCR não se recomenda análise de dosagem única, pois o vírus é encontrado em quantidades muito pequenas nos linfócitos B de memória e pode estar abaixo do nível de detecção do método. Desta forma o acompanhamento de várias medidas da CV pode refletir com maior fidelidade a existência de replicação viral⁴⁸. Indivíduos saudáveis com contato prévio com EBV podem apresentar 1 a 50 células infectadas por milhão de leucócitos. Isto equivale a uma CV no sangue total de 7 cópias (1 a 30 cópias) de DNA viral por milhão de leucócitos^{47,50}.

3.3. Carga viral do vírus de Epstein-Barr e linfomas em pacientes imunossuprimidos

A imunossupressão causada pelo HIV resulta em aumento do número de células com infecção latente pelo EBV no sangue periférico. Estas células podem se proliferar mediante redução da imunovigilância exercida por linfócitos T citotóxicos, permitindo maior expansão de linfócitos B infectados pelo EBV. Embora exista relação entre EBV e LNH em pacientes HIV –positivos, o EBV não é detectado em todos os ARL. Somente no LPSNC o EBV é detectado em quase 100% dos casos³.

O desenvolvimento de LNH em imunossuprimidos é comum em indivíduos submetidos a transplante de órgãos sólidos. Babcock et al.⁵¹, avaliaram amostras de sangue de 28 pacientes submetidos a transplante hepático e renal em uso de imunossupressores. Neste estudo quase 100% das células infectadas pelo EBV eram linfócitos B de memória, semelhante ao observado em indivíduos saudáveis. Em metade dos pacientes estudados, a replicação viral estava representada por células infectadas em fase de latência, com aumento na frequência de linfócitos B infectados no sangue em 2/3 dos pacientes em uso de imunossupressores. O uso de imunossupressores pode aumentar a replicação viral celular no tecido linfóide, com proliferação de células linfoblastóides e conseqüentemente eleva o risco de desenvolvimento de

linfoma. Entre os pacientes transplantados, o monitoramento da carga viral para EBV não foi comprovada como preditiva para o desenvolvimento de linfoma, mas poderia auxiliar em sua detecção precoce^{52,53,54}. Em pacientes HIV-positivos há evidências que mesmo em indivíduos em uso de HAART, assintomáticos para infecção pelo EBV e sem linfoma, a CV para EBV seja superior quando comparada a indivíduos controles HIV-negativos, independentemente do uso de terapia anti-retroviral e da quantidade de linfócitos T CD4. Stevens et al.⁵⁵, analisaram os níveis de DNA de EBV por PCR (qualitativa e quantitativa) no sangue total de indivíduos HIV-positivos com uso de HAART e monoterapia. No grupo com uso de HAART a positividade no sangue foi detectada em 64/109 (59%) pacientes dos quais 34% apresentavam níveis elevados no sangue. Nas amostras dos pacientes da era pré-HAART (monoterapia), 65/99 (64%) foram positivas e 28/65 (43%) destas amostras, apresentavam níveis elevados de DNA do EBV no sangue. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado e não tratado para a infecção pelo HIV. Ling et al.⁴, observaram que a média da CV do EBV no grupo infectado em uso de HAART foi significativamente maior comparada ao grupo de indivíduos não infectados pelo HIV, porém sem diferença no número médio de cópias de EBV em relação à contagem de linfócitos T CD4 nos pacientes HIV-positivos.

Nos pacientes HIV-positivos que não desenvolvem neoplasias relacionadas ao EBV, os linfócitos T citotóxicos específicos contra EBV permanecem com número e função estáveis. Porém, a função destes

linfócitos, mensurada por meio da capacidade de secretar interferon γ *in vitro* é inferior quando comparada com indivíduos saudáveis e diminui substancialmente nos indivíduos que desenvolvem ARL⁵⁶.

Van Baarle et al.⁵⁷, avaliaram a PCR quantitativa para EBV em PBMC e plasma em 21 indivíduos infectados pelo HIV em diferentes períodos de tempo variando de poucos anos após a soroconversão, do diagnóstico de Aids ou da infecção tardia pelo HIV. Nove indivíduos apresentaram ARL como doença definidora de Aids. Sete progrediram para Aids sem desenvolver linfoma. Cinco apresentaram infecções oportunistas e dois sarcoma de Kaposi. Cinco permaneceram assintomáticos com contagem de linfócitos T CD4 > 500 células/mm³ em mais de oito anos de seguimento. Durante os períodos estudados, a maioria dos pacientes com LNH apresentou aumento da CV para EBV em PBMC, mas sem valores superiores a 2×10^6 cópias/10⁶ PBMC. À época do diagnóstico do LNH a CV variou de $1,4 \times 10^3$ a $3,1 \times 10^6$ cópias/10⁶ PBMC. Entre os assintomáticos, a CV do EBV não foi detectada na fase precoce da infecção pelo HIV, mas períodos de escape foram detectados com níveis de $7,0 \times 10^4$ cópias/10⁶ PBMC. Da mesma forma, houve escape da CV do EBV no grupo de pacientes que progrediram para Aids. Quando a média da CV do EBV foi calculada para cada indivíduo na fase precoce e tardia, ou seja, nos primeiros e últimos quatro anos de seguimento, respectivamente, não houve diferença nos níveis absolutos da CV do EBV entre os pacientes com ARL e assintomáticos ou entre o grupo com ARL e o que progrediu para

Aids. Isto sugere que a CV absoluta do EBV em PBMC não foi preditiva para desenvolvimento de LNH. O EBV no plasma foi detectado em alguns indivíduos, mas em níveis muito menores do que em PBMC.

Foi realizado estudo de coorte com 9.621 pacientes HIV positivos com dados coletados desde 1983 para avaliar se a HAART estaria relacionado ao efeito protetor para desenvolvimento de linfoma. Em análise univariada, baixas contagens de linfócitos T CD4, CD8 e CD16/56 predispueram ao desenvolvimento de LNH. O uso de terapia anti-retroviral foi significativamente protetor contra o desenvolvimento de LNH, independentemente da classe do anti-retroviral utilizado quando comparado com indivíduos que não receberam a terapia. Em análise multivariada, idade acima de 39 anos, contagens de linfócitos T CD4 < 200 células/mm³ e T CD8 < 595 células/mm³ foram associados ao aumento no risco de LNH. Apesar de HAART não estar efetivamente relacionado ao controle da infecção pelo EBV, sua relação com a proteção contra o desenvolvimento de linfoma reforça a teoria de que fatores ligados diretamente ao HIV possam estar relacionados ao desenvolvimento desta neoplasia e não apenas a reativação da infecção pelo EBV⁵⁸.

3.4. FOXP3 e doença linfoproliferativa

A tolerância imunológica ou a não resposta do sistema imunológico a antígeno previamente exposto é fundamental ao equilíbrio do sistema imune. Após exposição a determinado antígeno, os linfócitos são

ativados ou inativados gerando tolerância ou simplesmente ignoram o antígeno. A tolerância a antígenos próprios do organismo é uma característica do sistema imune normal⁵⁹. A tolerância é mantida pela eliminação de linfócitos auto-reativos nos órgãos linfóides primários. Assim como pelo controle da ativação dos linfócitos e sua respectiva expansão nos órgãos linfóides secundários. Os linfócitos T regulatórios (Treg) são importantes para a tolerância periférica ao suprimirem a expansão e/ou ativação de células T auto-reativas. A maioria dos linfócitos Treg expressa o antígeno CD25 e constituem 5% a 10% dos linfócitos T CD4+ periféricos de camundongos e humanos. A depleção das células Treg causa doenças auto-imune como diabetes mellitus tipo 1, gastrite auto-imune e tireoidite em camundongos^{60,61,62}.

O gene “forkhead box P3” (*FOXP3*) humano localiza-se no braço curto do cromossomo X, codifica uma proteína também denominada FOXP3, e foi inicialmente caracterizado como gene responsável pela doença auto-imune inflamatória ligada ao cromossomo X. Em humanos, a mutação deste gene desregula o sistema imune e está relacionado com endocrinopatias múltiplas, enteropatia e síndromes relacionadas ao cromossomo X (IPEX), caracterizada por alta incidência de doença auto-imune. Estudos recentes demonstram que o fator de transcrição FOXP3 é expresso em células Treg (TCD4+/CD25+) e é o principal regulador e marcador específico destas células^{63,64}.

Em 1970, Burnet definiu o conceito de vigilância imunológica como uma função fisiológica do sistema imune incluindo reconhecimento e

destruição de células transformadas que potencialmente podem originar tumores e destruir células tumorais⁶⁵. Esta vigilância é variável para diferentes tumores e incapaz de atuar contra alguns tipos de câncer. Isto se justifica pelo fato de que as células tumorais derivam de células normais e alguns tumores induzem pouca resposta imunológica. Por outro lado, a capacidade de proliferação e de crescimento de determinado tumor pode superar a capacidade do sistema de imunovigilância, e alguns tumores podem desenvolver mecanismos de escape imunológico⁵⁹. Estudos mostram que o sistema imunológico pode não atuar contra tumores de capacidade imunogênica reduzida. Este conceito, conhecido como “immunoediting” ou “immune selection” é composto por três fases. Na primeira ou de eliminação, o tumor pode ser erradicado pelo sistema imune após ser reconhecido através de sinais pró-inflamatórios. Se a eliminação das células tumorais não for efetiva haverá uma fase de equilíbrio com manutenção crônica de algumas células. Conseqüentemente poderá aparecer uma variante da célula tumoral capaz de escapar do sistema imunológico e promover o aparecimento clínico do tumor⁶⁶.

As células Treg podem bloquear a resposta imune antitumoral. A presença destas células foi descrita em carcinoma de pequenas células de pulmão e câncer de ovário e melanoma, relacionadas a pior prognóstico^{67,68,69}.

O desenvolvimento dos linfomas de células B ocorre durante a maturação destas células, a qual em muitas fases envolve estímulo

antigênico dependente de linfócitos T. Os linfócitos T helper (Th) ativam a hipermutação somática da região variável das cadeias pesadas da Ig e a troca de classes das Ig. Estes processos envolvem múltiplas recombinações gênicas que podem resultar em aberrações do genoma e consequentemente em linfoma. As células Treg suprimem as células Th e suas respectivas funções a exemplo da estimulação da síntese de Ig e da manutenção da sobrevivência das células B^{2,59,62}. De forma oposta ao encontrado em tumores sólidos FOXP3 foi relacionado à melhor prognóstico no linfoma. Lee et al⁷⁰. identificaram um subgrupo de células FOXP3+ infiltrando amostras de tecido de LDGCB por IH. Os casos com alto índice de células neoplásicas FOXP3+ apresentaram maior SG. Tzankov et al.⁷¹, em análise IH em 926 amostras de diferentes linfomas observaram correlação positiva entre maior número de células FOXP3+ e maior SG em LDGCB e LH clássico.

4. Métodos

Foi realizada análise prospectiva de pacientes infectados pelo HIV com diagnóstico de linfoma relacionado à Aids acompanhados pela Hematologia no Instituto de Infectologia Emílio Ribas e no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo no período de Fevereiro de 2009 até Fevereiro de 2010.

Foram incluídos 15 pacientes diagnosticados com ARL por biópsia analisada por hematoxilina-eosina e IH de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde³. Todos os pacientes foram estadiados pelo sistema de estadiamento de Ann Arbor antes do tratamento do linfoma⁷². Os pacientes com doença sistêmica receberam tratamento com dose padrão do esquema CHOP (ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona)⁷³. Na ausência de comprometimento do líquido cefalorraquidiano, profilaxia quimioterápica foi realizada com administração intratecal de 50 mg de citarabina semanal, nas primeiras quatro semanas do tratamento. Na presença de comprometimento do líquido cefalorraquidiano (LCR), a mesma quimioterapia intratecal foi administrada duas vezes na semana até o desaparecimento das células do linfoma do LCR. O fator estimulador de colônias de granulócitos foi prescrito por via subcutânea na dose de 300µg/dia a partir do quinto dia após cada ciclo de quimioterapia até a contagem de neutrófilos $\geq 1,5 \times 10^9/L$. Eritropoetina recombinante humana na dose de 300UI/kg foi

prescrita a pacientes com níveis de hemoglobina $\leq 10\text{g/dL}$ ao diagnóstico ou durante o tratamento. Todos os pacientes receberam profilaxia para pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* e outros antibióticos foram prescritos a critério do infectologista ou hematologista. HAART havia sido prescrita a todos os pacientes que apresentavam o diagnóstico de Aids prévio ao diagnóstico de linfoma e quando o linfoma era considerado uma doença definidora de Aids. Os esquemas anti-retrovirais que incluíam zidovudina foram trocados antes da realização de quimioterapia por risco de toxicidade hematológica. A resposta ao tratamento do linfoma foi avaliada após o terceiro, sexto e oitavo ciclos de quimioterapia e classificado como resposta completa (RC), resposta completa não confirmada, resposta parcial (RP) ou doença progressiva, de acordo com o International Workshop criteria⁷⁴. Pacientes com progressão de doença ou recidiva foram tratados com esquema de salvamento ICE (Ifosfamida, etoposídeo e carboplatina)⁷⁵.

Todos os pacientes do estudo foram submetidos à coleta de sangue venoso para mensurar a carga viral do EBV em três períodos de tempo: ao diagnóstico, após o término do tratamento e três meses após término do tratamento.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa das Instituições acima descritas, após a aprovação no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa. Os pacientes incluídos no estudo foram informados do mesmo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo A).

Foram incluídos 30 indivíduos saudáveis HIV-negativos e 26 indivíduos HIV-positivos assintomáticos em uso de HAART sem evidência de infecção oportunista e sem diagnóstico de linfoma como grupos controles pareados por sexo e idade somente para análise e comparação da carga viral para EBV com o grupo estudado. Todos os indivíduos foram informados do estudo e assinaram o TCLE (anexo B).

4.1 Detecção do EBV

4.1.1 Hibridização *in situ*

A reação foi realizada em amostra de biópsia diagnóstica. Foram realizados 10 cortes de 3 µm de espessura do bloco de parafina os quais foram colocados em dez lâminas de vidro previamente fixadas com N-silano. Este material biológico foi enviado ao exterior conforme resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) número 196 de 10/10/96 e da resolução do CNS 292 de 08/07/99 pelo “courrier” OCASA.

A detecção de EBV foi realizada pela técnica de hibridização *in situ* no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Kurume, Japão, pelo Dr. Kouichi Ohshima.

A determinação de RNA do EBV para a hibridização *in situ* foi obtida utilizando-se o kit da DakoCytomation PNA ISH probe. As amostras cortadas e fixadas em lâminas de vidro foram inicialmente submetidas a reidratação com xileno e etanol, pré-tratadas com 150µL de proteinase K diluída (1:10 em TBS), e hibridizadas com PNA probe conjugada com

fluoresceína (25µL). Depois de lavadas, a detecção foi feita utilizando-se o segundo anticorpo anti-FITC/AP, com posterior adição de substrato (BCIP/NBT/levamisole) e contracoloração com hematoxilina. As células consideradas positivas foram as que apresentaram o núcleo corado de marrom, em microscópio óptico (aumento de 60 vezes), de acordo com a graduação de Dupuis et al ⁷⁶.

4.1.2 Carga viral para o vírus de Epstein-Barr

A determinação da carga viral para EBV foi realizada pelo método de PCR quantitativa em tempo real no Departamento de Biologia Molecular da Divisão de Sorologia da Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo, coordenado pela Dra. Ester Cerdeira Sabino.

A extração do DNA foi realizada a partir de 200µL de plasma e PBMC previamente armazenado a – 20°C utilizando com o *kit* de extração da QIAGEN conforme protocolo do fabricante e como controle interno para o plasma foi utilizado 2µL da vacina de adenovirus canino (Vanguard -HTLP-SCV-L) na diluição 1:100 e o gene da albumina foi utilizado como controle interno para PBMC. Parte da região do gene BZLF1 foi amplificada usando-se os iniciadores EBV_F e EBV_R e a sonda marcada EBV_P. Mix de amplificação foi preparado com 10µL de DNA e amplificado no termociclador (Real time Icyler, Biorad) com ciclo inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, coletando-se a imunofluorescência na

extensão (60°C). Em seguida 10µL das diluições seriais do PCR EBV foram adicionadas correspondendo a 2,7 cópias/reação a $2,7 \times 10^6$ cópias/reação para padronização da curva do plasma. Da mesma forma, 10µL de diluições seriais para o produto PCR do gene da albumina foram adicionadas, correspondendo a 2,0 cópias/reação a $2,0 \times 10^6$ cópias/reação para obtenção da curva padrão do controle interno de PBMC. O limite mínimo para detecção do teste no plasma foi ≥ 68 cópias/mL.

4.1.3 Expressão de FOXP3

A detecção de FOXP3 foi realizada pela técnica de IH no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Kurume, Japão, pelo Dr. Kouichi Ohshima.

Os cortes dos blocos de biópsia foram fixados em lâminas de vidro e desparafinizados com banhos sucessivos de xilol e reidratados com banhos sucessivos de álcool em concentrações decrescentes. A recuperação antigênica foi feita em EDTA a 95 graus (pH 8.0) por 30 minutos. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com banho de água oxigenada a 2%, seguida de banhos com água deionizada. As lâminas foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) e em seguida incubadas em solução contendo o anticorpo primário específico para FOXP3 (NB600-242 NOVUS biologicals, Littleton-EUA), em cuba de imuno-histoquímica. Após incubação as lâminas foram lavadas em três banhos de PBS e incubadas com anticorpo secundário por duas horas.

Após este período foi realizada nova lavagem com PBS e em seguida nova incubação com estreptoavidina enzima peroxidase, por duas horas. A revelação do complexo anticorpo substrato foi realizada com solução de PBS contendo diaminobenzidina (DAB) e água oxigenada. A positividade foi visualizada pela coloração marrom (núcleo) presente no tecido, por microscopia óptica (aumento de 60 vezes), com contagem >30%.

4.1.4 Análise estatística

A comparação entre o grupo de ARL e grupos controles foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis no caso de variável contínua. Caso a diferença fosse significativa foram comparados posteriormente (*post hoc*) dois a dois pelo teste não paramétrico de Mann Whitney. Para as variáveis discretas foi utilizado o teste exato de Fisher. A comparação entre os grupos de pacientes com ARL em remissão completa, com doença progressiva para as variáveis de EBER (negativo e positivo), óbito e não óbito foi realizado teste não paramétrico de Mann Whitney. Caso a variável fosse discreta, utilizou-se o teste exato de Fisher. As comparações da carga viral para EBV em PBMC e plasma (inicial, ao término do tratamento e aos 3 meses após tratamento) foram feitas duas a duas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. A curva de sobrevida foi construída pelo método de Kaplan e Meier.

Para analisar a relação entre carga viral para EBV em sangue total e plasma, foi utilizada a correlação de Spearman. Em todas as

comparações considerou-se como significativa as probabilidades associadas aos testes menores que 0,050.

5. Resultados

As características clínicas dos pacientes são mostradas na tabela 2. Treze (86,7%) pacientes eram do sexo masculino e 2 (13,3%) feminino, com mediana de idade de 43 anos (28 – 66 anos). Os fatores de risco para infecção pelo HIV foram contato sexual em 14 pacientes (93,3%) e uso de droga intravenosa em 1 paciente (6,7%). O diagnóstico de linfoma difuso de grandes células B foi realizado em 10 casos (66,7%), linfoma de Burkitt em 4 (26,7%) e linfoma primário de sistema nervoso central em 1 (6,7%). Onze (73,3%) pacientes apresentavam estágio III ou IV ao diagnóstico. O escore de índice prognóstico internacional (IPI) como risco intermediário e alto risco foi observado em 7 (46,7%) dos pacientes. A mediana da contagem de linfócitos T CD4 ao diagnóstico foi de 215 células/ μ L (43-930), e 6 (40,0%) pacientes apresentaram carga viral para HIV abaixo do limite de detecção (50 cópias/ μ L).

A evolução dos pacientes do estudo é apresentada na figura 3. Catorze (93,3%) pacientes foram tratados com 6 a 8 ciclos do esquema CHOP. O paciente com LPSNC foi tratado somente com radioterapia em SNC, obtendo RC de curta duração evoluindo para óbito em decorrência de choque séptico três meses depois. Nove de 15 pacientes (60%) completaram o tratamento proposto e obtiveram RC. Destes, 5/9 (55,5%) foram a óbito, 2/5 (40%) em recidiva. Dois (13,3%) dos 15 pacientes evoluíram para óbito antes de serem reavaliados. Outros 2/15 (13,3%) apresentaram progressão de doença e morreram. Um dos quais após

quimioterapia de salvamento para linfoma. Um (6,7%) paciente abandonou tratamento após o primeiro ciclo de quimioterapia e apresentou desfecho fatal. Todos os pacientes com recidiva ou progressão exceto um foram a óbito por septicemia. Porém em apenas um caso o agente infeccioso foi documentado, tratava-se de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiplas drogas em hemocultura.

Quatro (26,6%) de 15 pacientes iniciaram HAART ao diagnóstico de linfoma. Dois usaram dois inibidores de transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (ITRN) e um inibidor da protease (IP). Dois pacientes usaram dois ITRN e um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN). Dez (66,7%) pacientes estavam em uso de HAART ao diagnóstico do linfoma. Quatro (26,6%) pacientes com dois ITRN e um IP e seis (40%) pacientes com dois ITRN e um ITRNN. Um (6,7%) paciente não utilizou HAART apesar de prescrito antes do diagnóstico do linfoma e iniciou dois ITRN e um IP.

A carga viral para EBV em PBMC e no plasma foi realizada em todos os pacientes ao diagnóstico. Em 10/15 (66,7%) pacientes após o término da quimioterapia, em um (6,7%) paciente após radioterapia e em 4/15 (26,6%) pacientes três meses após o término do tratamento. A mediana da carga viral para EBV antes do tratamento foi 13 cópias/ 10^6 PBMC (1-1472 cópias/ 10^6) e 70 cópias/mL (0-24900 cópias/mL) no plasma. Após o tratamento a CV para EBV foi de 0,5/ 10^6 PBMC (0-109,5) e indetectável no plasma. Desta forma houve diminuição significativa da CV em PBMC ($p=0,022$) e no plasma ($p=0,003$) ao término do tratamento em

comparação ao diagnóstico. Nos pacientes em RC, a CV para EBV diminuiu tanto no plasma como em PBMC na maioria dos casos (figura 4). A sobrevida global aos 12 meses foi 21,4% (figura 5), com mediana de SG de 4,9 meses. Não houve correlação estatisticamente significativa entre CV para EBV em PBMC e plasma com o número de linfócitos T CD4 ou com a CV para HIV ao diagnóstico do ARL ($r=0,166$ $p=0,554$). Não houve diferença entre tipo de anti-retroviral utilizado e CV para EBV em PBMC ou plasma.

A mediana da CV para EBV no plasma foi indetectável nos indivíduos dos grupos controles avaliados. O grupo de pacientes com ARL apresentou maior CV para EBV no plasma antes do tratamento em comparação aos controles ($p<0,001$). A mediana da CV para EBV no grupo controle HIV-positivo foi de 1,0 cópia/ 10^6 PBMC (0 – 12,5), sendo indetectável no grupo HIV-negativo. Houve diferença estatisticamente significativa na CV para EBV em PBMC entre grupo controle HIV-positivo e grupo de pacientes com ARL ($p=0,024$). Assim como entre o grupo controle HIV-negativo e o grupo com ARL ($p<0,001$) e entre grupo controle HIV-positivo e HIV-negativo ($p=0,002$).

A hibridização *in situ* para EBER resultou positiva em 7/15 (46,7%) casos, sendo significativamente superior no grupo de ARL com mais de um sítio extralinfonodal comprometido ($p=0,041$) e com linfócitos T CD4 <100 células/ μ L ($p=0,026$). A mediana da carga viral para EBV em PBMC antes do tratamento foi superior nos pacientes com ARL EBER (+) em

relação aos EBER (-) ($p=0,041$). A expressão de FOXP3 foi negativa em 15/15 (100%) dos pacientes com ARL.

Tabela 2. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes

Idade anos , mediana (variação)	43 (28-66)
Sexo , n (%)	
Feminino	2 (13,3)
Masculino	13 (86,7)
Fatores risco HIV , n (%)	
Homossexual	8 (53,3)
UDIV	1 (6,7)
Heterossexual	6 (40,0)
Aids prévio , n (%)	
Sim	11 (73,3)
Não	4 (26,7)
Contagem CD4 células/μL , n (%)	
<100	10 (66,7)
$\geq$ 100	5 (33,3)
Tipo histológico , n (%)	
LDGBC	10 (66,7)
LB	4 (26,7)
LPSNC	1 (6,7)
Sintomas B , n (%)	
Presente	13 (86,7)
Ausente	2 (14,3)
Estadio , n (%)	
I / II	4 (26,7)
III / IV	11 (73,3)
Sítios extralinfonodais , n (%)	
Sim	12 (80,0)
Não	3 (20,0)
Número sítios extralinfonodais , n (%)	
0-1	9 (60,0)
$\geq$ 2	6 (40,0)
DHL U/L, mediana (variação)	386,0 (161-10.308)
Nível DHL ,n (%)	
$\leq$ normal	7 (46,7)
> normal	8 (53,3)

Figura 3. Evolução dos pacientes incluídos no estudo

Figura 4. Carga viral para EBV (plasma e PBMC) em pacientes com ARL em remissão completa

Figura 5. Sobrevida global dos pacientes com ARL

6. Discussão

Este estudo investigou a carga viral do EBV e a expressão de FOXP3 em pacientes com linfoma relacionado à Aids nas Instituições descritas. O resultado demonstrou que a mediana da CV para EBV no plasma e PBMC dos pacientes com ARL diminuiu significativamente após o tratamento nos pacientes que adquiriram RC em comparação aos níveis encontrados ao diagnóstico. Além disso, a CV permaneceu em níveis baixos nos pacientes que permaneceram vivos e em RC.

Outro importante resultado obtido neste estudo refere-se ao fato de que a mediana da CV para EBV em PBMC no grupo controle HIV-positivo foi significativamente superior à CV encontrada no grupo HIV negativo e inferior à do grupo de ARL. A mediana da CV para EBV no plasma foi significativamente maior nos pacientes com ARL. A importância destes resultados ancora-se no fato de que a existência de EBV no compartimento extracelular pode estar refletindo uma possível reativação dos vírus em linfócitos B latentes ou a lise celular e a consequente liberação das partículas virais, com estímulo para proliferação de linfócitos B. Corroborando assim para o melhor entendimento da patogênese dos ARL.

A partir dos resultados obtidos neste estudo é razoável sugerir que a CV para EBV poderia ser incluída como marcador adicional para monitorar a resposta ao tratamento de pacientes com ARL. Assim o papel

da CV nestes pacientes poderia ser avaliado em estudos prospectivos e com maior casuística para determinar seu real impacto nos ARL. Embora a avaliação da CV para EBV final prevista para ser realizada aos três meses após término do tratamento tenha sido efetivamente realizada em somente quatro pacientes; acreditamos ainda ser possível valorizar este dado, pois são pacientes com reduzida chance de aquisição de RC e de longa sobrevida. No acompanhamento dos pacientes a CV ao longo do tempo também pode ser útil para verificar se o aumento da mesma está relacionada à maior chance de recidiva.

Nossos dados estão de acordo com estudo de Fan et al.⁶ que avaliaram a CV para EBV no plasma de 35 pacientes HIV-positivos com linfoma e a detectaram em 74% dos casos. Em todos os pacientes com amostra tumoral positiva para EBER (n=17) a CV para EBV foi detectada. Além disso, observaram redução dos valores da CV para EBV após tratamento do linfoma em 13 pacientes que se submeteram a nova dosagem de CV plasmática durante e após o tratamento. Bonnet et al.⁷ dosaram a CV para EBV no sangue total de 14 pacientes com ARL, em 19 pacientes HIV-positivos sem Aids e em 20 controles HIV-negativos. Não houve diferença entre os pacientes com ARL e HIV-positivos sem linfoma, porém pacientes com ARL apresentaram aumento significativo da CV para EBV comparado ao grupo HIV-negativo. Os pacientes com ARL que obtiveram RC apresentaram redução significativa da CV para EBV.

Alguns autores com base nestes dados, apesar de não haver comprovação na literatura de que os valores da CV para EBV possam ser preditivos de desenvolvimento de ARL em portadores de HIV, interrogam o papel da terapia anti-EBV para os pacientes com ARL. Até o momento não existe fármaco específico anti-EBV para uso *in vivo*. Os antivirais aciclovir e ganciclovir inibem *in vitro* a fase lítica da infecção pelo EBV, porém a efetividade para forma intracelular é controversa^{2,43}. Estudo avaliou retrospectivamente 29 pacientes HIV-positivos portadores de LNH e 58 HIV-positivos sem LNH tratados com aciclovir ou antivirais similares. Estes pacientes foram comparados com controle histórico composto por 304 pacientes com Aids. Os subgrupos analisados foram divididos pelo tempo de tratamento e a dose de antiviral utilizada. Os casos que receberam alta dose de aciclovir ou similar por mais de um ano foram alocados como grupo I. Os tratados com doses baixas ou intermitentes de ganciclovir ou foscarnet por período inferior a um ano foram denominados de grupo II e os não tratados com foscarnet ou ganciclovir ou aciclovir como grupo III. Dos 29 pacientes com LNH, 22 (72,4%) nunca receberam aciclovir ou similar em comparação a 19 (32,8%) indivíduos do grupo controle ($p=0.002$). Entre os indivíduos do controle histórico, o grupo I apresentou a menor taxa de progressão para LNH ($p=0.0020$). Embora esse estudo não tenha sido realizado de forma prospectiva e a presença de heterogeneidades significativas entre as populações analisadas os autores sugeriram provável ação protetora do uso de antiviral para desenvolvimento de ARL⁷⁷. Como desvantagens do

tratamento com antiviral sem indicação precisa e comprovada estão possíveis eventos adversos associados ao uso destes fármacos, a exemplo da mielotoxicidade e nefrotoxicidade.

Há poucos relatos sobre o uso do tratamento antiviral para EBV em ARL, com pequeno número de pacientes e resultados controversos^{78,79,80}.

O significado real da CV para EBV na vigência da infecção pelo HIV não está bem estabelecido. Os poucos estudos efetuados sobre este assunto terminaram por mostrar resultados conflitantes, porém aumento da CV para EBV em pacientes HIV-positivos assintomáticos é descrito na literatura^{4,5}. Entretanto, torna-se difícil a interpretação desses resultados, em parte por causa da heterogeneidade da população alvo devido aos diferentes estados da infecção pelo HIV, da aderência a terapia anti-retroviral, à presença de infecções oportunistas e o estado da reconstituição imune. Assim, não há parâmetro da CV para EBV que possa ser considerado normal entre a população de indivíduos HIV - positivos e talvez seja necessário avaliar grupos de pacientes (com e sem uso de HAART, doença avançada pela infecção do HIV) separadamente. Outro questionamento ainda em aberto refere-se ao estabelecimento do tipo mais prevalente de latência de infecção pelo EBV na população HIV positiva.

Em nossa casuística, a maioria dos pacientes evoluiu a óbito por causas infecciosas. Mesmo os que estavam em RC tiveram curtos períodos de seguimento, não sendo possível obter conclusões definitivas

em relação à sobrevida global e a CV para EBV. A presença de EBER nas amostras de tumor destes pacientes ocorreu em 7/15 (46,7%) pacientes e foi associada ao envolvimento de mais de um sítio extralinfonodal e a contagem de linfócitos T CD4 < 100 células/ μ L. Assim, os casos com EBER no tumor apresentaram estádios clínicos mais avançados e importante comprometimento do sistema imune. Por conseguinte estariam mais predispostos a terem pior evolução clínica devido a infecções oportunistas. Estudos com pacientes portadores de linfoma HIV-negativos, com presença de EBV nas amostras de biópsia têm reforçado a associação entre presença de EBER e pior prognóstico e a estádios clínicos avançados^{81,82}.

A mediana da CV para EBV em nosso estudo foi superior em PBMC ao diagnóstico do ARL em casos com positividade para EBER no tumor. Uma razoável explicação para este resultado poderia estar na existência de uma associação entre maior número de linfócitos B infectados por EBV em pacientes com sistema imune comprometido e reduzida resposta celular T anti-EBV. Nossa hipótese está de acordo com os resultados obtidos por van Baarle et al. que verificaram significativa redução da função específica T CD8 contra o EBV em pacientes com ARL e ao longo da infecção pelo HIV. A diminuição da função das células T foi associada a maior CV para EBV em PBMC refletindo o arrefecimento do controle antiviral pelo sistema imune⁵⁸. Além disso, pacientes com ARL apresentam comportamento clínico mais agressivo e pior prognóstico quando comparados aos pacientes com LNH sem infecção pelo HIV. Isto

é particularmente verdadeiro para ARL em pacientes com contagem de linfócitos T CD4 <100 células/ μ L^{1,83}. Em nossa casuística quase todos os pacientes com ARL que evoluíram para óbito apresentaram como causas de morte complicações infecciosas, confirmando o alto grau de comprometimento imune dos pacientes.

A expressão da proteína FOXP3 não foi observada em nenhum paciente com ARL não permitindo sua avaliação como fator de prognóstico. FOXP3 tem como função controlar a atividade das células Treg presentes no microambiente tumoral, além de supostamente participar da patogênese de neoplasias malignas. Entretanto seu papel é diferente em neoplasias hematológicas e não hematológicas. Nos tumores sólidos como próstata, mama e ovário a expressão de FOXP3 foi associado a pior prognóstico^{84,85,86}. Nestes tumores é possível que as células neoplásicas possam estimular o recrutamento de células Treg (CD4+, CD25+, FOXP3+) para o microambiente tumoral com o objetivo de manter um estado de imunossupressão e, por conseguinte evitar uma possível resposta antitumoral. A expressão de FOXP3 é pouco estudada em linfoma e até o momento não encontramos nenhum trabalho avaliando expressão de FOXP3 em ARL. Em pacientes com linfoma e HIV-negativos o número elevado de células FOXP3+ no tecido tumoral foi associado a melhor prognóstico^{70,71,87}. Porém, outros estudos são necessários para avaliar sua expressão em linfomas em geral, associados ou não ao HIV.

7. Conclusões

A expressão de EBER foi positiva em 7/15 (46,7%) dos pacientes com linfomas relacionados à Aids e superior de forma significativa nos pacientes com ARL com comprometimento de mais de um sítio extralinfonodal ($p=0,041$) e linfócitos T CD4 <100 células/ μ L ($p=0,026$).

A expressão de FOXP3 tumoral foi negativa em todos os casos estudados, não sendo possível estabelecer seu papel no prognóstico de ARL.

A mediana da carga viral para EBV em PBMC ao diagnóstico foi superior nos pacientes com ARL EBER (+) em relação aos EBER (-) ($p=0,041$).

Observou-se diminuição estatisticamente significativa da mediana da carga viral para EBV em PBMC ($p=0,022$) e plasma ($p=0,003$) após o tratamento do ARL em comparação aos valores do diagnóstico em pacientes que atingiram remissão completa, o que poderia ser considerado um marcador de melhor prognóstico da resposta à terapia.

Anexo A

DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGIA -HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

E

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV), expressão de FOXP3 e avaliação da carga viral para EBV como marcadores prognósticos nos linfomas relacionados à AIDS.

É necessário que você leia e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, se você não entender qualquer palavra ou informação, por favor, peça ao médico que explique.

Você está sendo convidado a participar de um estudo para avaliar a carga viral para detecção do vírus de Epstein-Barr, detecção de EBER e expressão de FOXP3 em pacientes com linfoma relacionado à AIDS

Doença do estudo:

Sabe-se que o indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) possui chance maior do que a população geral (não infectada) de desenvolver linfomas e geralmente são linfomas chamados não-Hodgkin de células B, constituindo doença agressiva. Neste caso, considera-se que a presença deste linfoma em paciente HIV positivo já define a presença da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). O linfoma se desenvolve a partir dos gânglios linfáticos (ínguas) que fazem parte do sistema linfático. O sistema linfático tem como função proteger o organismo de doença e infecção e está localizado na forma de pequenos caroços encontrados no pescoço, embaixo dos braços, na virilha, no abdome e está ligado a veias bem finas que carregam a linfa (substância que age contra doenças e infecções) para todo o corpo.

Os motivos para o linfoma se desenvolver nas pessoas com HIV não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que o próprio HIV ajuda na produção de substâncias que poderiam fazer com que as células dos gânglios linfáticos aumentassem de número com chance de aparecer algumas células de câncer. Além disso, um outro vírus chamado Epstein-

Barr (EBV) pode ser encontrado dentro do linfoma e por causa da baixa resistência causada pelo HIV consegue se reproduzir e também faz com que as células dos gânglios aumentem em número de forma bastante rápida com grande chance de transformação de células normais em células de câncer.

O sistema imunológico é um sistema do organismo para se defender em casos de infecção, produzindo células que têm a função de destruir os micróbios e que pode ter alguma ação na defesa do organismo contra o aparecimento de tumores malignos. Desta forma, pacientes onde o sistema imunológico não funciona de forma correta (AIDS, transplantados, doenças auto-imunes) têm maior chance de desenvolver tumores malignos.

Existe um gene (regulador da função da célula – “diz” para a célula como ela deve funcionar corretamente através da produção de proteínas ou substâncias que agem na célula) chamado FOXP3, que parece estar relacionado com algumas células que controlam o funcionamento do sistema imunológico. Alguns estudos mostram que a presença de FOXP3 parece estar relacionada com a sobrevida em pacientes com tumores.

O tratamento dos linfomas relacionados a AIDS consiste na quimioterapia e em alguns casos radioterapia associada.

Objetivos do estudo:

O estudo tem como objetivo avaliar a presença do vírus de Epstein-Barr além da expressão do gene chamado FOXP3 e avaliação da multiplicação do vírus de Epstein-Barr no sangue (através do exame de carga viral para EBV) em pacientes com linfomas relacionados a AIDS e relacionar o que for encontrado com a evolução do linfoma (resposta ao tratamento e característica do tumor).

Como será feito o estudo:

O estudo será realizado através da análise da biópsia que já foi feita para diagnóstico com resultado de linfoma e este material encontra-se em um bloco de parafina, guardado no laboratório de patologia; uma parte deste material será cortado em pedaços muito finos (muito mais finos do que uma folha de papel sulfite – 0,003 milímetros de espessura) e colado a uma

lâmina de vidro (total de dez lâminas) para realização dos estudos para detecção do EBV (que será detectado através da presença de uma proteína produzida por este vírus chamada EBER) e FOXP3 que serão realizados em um laboratório no Japão (Departamento de Patologia-Universidade de Kurume). Somente serão enviadas as lâminas para o Japão, sendo que o restante do material retirado para fazer o diagnóstico de linfoma continuará guardado no laboratório do hospital.

Além disso, será necessária a coleta de 5 mL (uma colher de chá) de sangue de uma veia antes de começar o tratamento, logo após o último tratamento e três meses após o término do tratamento para avaliação da carga viral do EBV (para saber como o vírus EBV está se multiplicando em seu organismo com o tratamento quimioterápico). Geralmente a punção venosa para coleta de exame não traz danos ao paciente, mas pode ocorrer hematoma local que é causado pela saída de sangue embaixo da pele, formando no local da punção, uma mancha azulada que evolui para marrom, esverdeada, amarelada desaparecendo em poucos dias, voltando a pele à cor normal. Geralmente não há complicações. A literatura médica mostra que ocorre em cerca de 1,1% das coletas em homens e em 5,2% nas mulheres.

Serão também utilizados dados presentes em seu prontuário médico, para que possamos avaliar a resposta ao tratamento do linfoma.

O acompanhamento e tratamento do linfoma não sofrerá nenhuma mudança em virtude dos resultados obtidos no estudo, ou pelo seu consentimento em participar do mesmo. Os resultados do estudo serão publicados, mas em nenhum momento o seu nome será revelado.

Benefícios:

Os benefícios do estudo incluem melhor entendimento tanto da fisiopatologia (porque o linfoma aparece) como a resposta ao tratamento deste tipo de tumor (se o vírus EBV pode estar ligado ao aparecimento do linfoma e se a presença de FOXP3 pode estar relacionada a melhor ou pior resposta ao tratamento). Se quiser, os resultados dos seus exames realizados neste estudo serão informados para você, quando o estudo estiver terminado.

Segurança do paciente:

A Comissão de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas aprovou a realização do estudo, considerando-o ético e seguro, sendo que o mesmo será conduzido de acordo com as exigências da lei brasileira para realização de estudos clínicos.

Confidencialidade:

Todas as informações obtidas sobre a doença e tratamento durante o estudo são confidenciais e os dados que serão analisados no estudo serão publicados mas o nome do paciente não será revelado.

Se você tiver dúvidas sobre o estudo entre em contato com o médico:

Pacientes acompanhados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas:

Dra. Paula Yurie Tanaka - Hematologista
 Serviço de Hematologia - Instituto de Infectologia Emílio Ribas
 Av. Dr. Arnaldo, n.165 - primeiro andar – ambulatório de especialidades– São Paulo
 Telefone: (011) 3896-1388 3896-1198

Se você tiver dúvidas sobre a ética do estudo entre em contato com:

Comitê de Ética em Pesquisa – Instituto de Infectologia Emílio Ribas
 Av. Dr. Arnaldo, 165 – casa azul
 Tel.: (011) 3896-1406

Pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas:

Dr. Luis Fernando Pracchia / Dra. Juliana Pereira
 Departamento de Hematologia - Hospital das Clínicas
 Prédio dos ambulatórios do Hospital das Clínicas – Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155
 Primeiro andar – hospital dia
 Telefone: 3061-5544 ramal 275

Se você concordar em participar do estudo será necessário um consentimento por escrito de sua parte

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, abaixo assinado, declaro pela presente que:

1. Li ou foi lido para mim, na íntegra o formulário de informações ao paciente, isto é, o conteúdo do estudo no idioma nacional que eu entendo e recebi explicações suficientes a respeito.
2. Tive oportunidade de fazer perguntas ao médico do estudo e recebi respostas satisfatórias.
3. Recebi uma cópia do formulário de informações para arquivo.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 200 .

 Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

ou responsável legal

 assinatura autores/pesquisador

(carimbo ou nome Legível)

Anexo B

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
GRUPO CONTROLE**

Título: Detecção do vírus de Epstein-Barr (EBV), expressão de FOXP3 e avaliação da carga viral para EBV como marcadores prognósticos nos linfomas relacionados à AIDS.

É necessário que você leia e entenda o estudo antes de assinar este documento. Por isso, se você não entender qualquer palavra ou informação, por favor, peça ao médico que explique.

Você está sendo convidado a participar de um estudo para avaliar a carga viral para detecção do vírus de Epstein-Barr, como grupo controle.

Doença do estudo:

Sabe-se que o indivíduo infectado pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) possui chance maior do que a população geral (não infectada) de desenvolver linfomas e geralmente são linfomas chamados não-Hodgkin de células B, constituindo doença agressiva. Neste caso, considera-se que a presença deste linfoma em paciente HIV positivo já define a presença da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). O linfoma se desenvolve a partir dos gânglios linfáticos (ínguas) que fazem parte do sistema linfático. O sistema linfático tem como função proteger o organismo de doença e infecção e está localizado na forma de pequenos caroços encontrados no pescoço, embaixo dos braços, na virilha, no abdome e está ligado a veias bem finas que carregam a linfa (substância que age contra doenças e infecções) para todo o corpo.

Os motivos para o linfoma se desenvolver nas pessoas com HIV não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que o próprio HIV ajuda na produção de substâncias que poderiam fazer com que as células dos gânglios linfáticos aumentassem de número com chance de aparecer algumas células de câncer. Além disso, um outro vírus chamado Epstein Barr (EBV), que infecta a maior parte das pessoas na infância ou adolescência e normalmente causa uma infecção chamada mononucleose infecciosa que é auto-limitada (a infecção se resolve sem precisar de remédios contra o vírus), e o EBV pode permanecer em estado de latência (em quantidades muito baixas dentro do corpo, mas sem causar doença).

O EBV pode ser encontrado dentro do linfoma e por causa da baixa resistência causada pelo HIV consegue se reproduzir e também faz com que as células dos gânglios aumentem em número de forma bastante rápida com grande chance de transformação de células normais em células de câncer.

Estamos fazendo um estudo em pacientes HIV-positivos com linfomas relacionados à AIDS, medindo a carga viral para o vírus de Epstein-Barr para saber se tem relação com o resultado do tratamento de linfomas.

Para avaliar melhor esse resultado, necessitamos compará-los com um grupo controle, formado por indivíduos que, no caso deste estudo, realizarão um exame somente para comparar os resultados com o grupo de pacientes estudado (linfomas e AIDS). Assim, você está sendo convidado a fazer parte do grupo controle. Nenhum outro exame ou procedimento será realizado além do que já explicado neste termo. O grupo controle será formado por: Indivíduos HIV-positivos sem diagnóstico de linfoma e sem doenças infecciosas (chamadas oportunistas), e um outro grupo de indivíduos HIV-negativos sem linfoma.

Objetivos da realização do exame de carga viral do vírus de Epstein Barr

A realização deste exame tem como objetivo avaliar a presença do vírus de Epstein-Barr no sangue (através do exame de carga viral para EBV – para saber a quantidade de vírus presente no seu sangue), para comparar esse resultado de exame com os dos indivíduos infectados com linfomas relacionados a AIDS.

Como será feito o exame:

Será necessária a coleta de 5 mL (uma colher de chá) de sangue de uma veia uma única vez. Geralmente a punção venosa para coleta de exame não traz danos ao paciente, mas pode ocorrer hematoma local que é causado pela saída de sangue embaixo da pele, formando no local da punção, uma mancha azulada que evolui para marrom, esverdeada, amarelada desaparecendo em poucos dias, voltando a pele à cor normal. Raramente pode ocorrer infecção no local da retirada do sangue.

Confidencialidade

Os resultados do seu exame serão publicados, mas em nenhum momento o seu nome será revelado.

Se você quiser, os resultados deste exame de carga viral para EBV poderão ser fornecidos a você, quando o estudo estiver terminado.

Benefícios:

Os benefícios do estudo incluem melhor entendimento tanto da fisiopatologia (porque o linfoma aparece) com o prognóstico do tumor (se o vírus EBV pode estar ligado a melhor ou

pior evolução do linfoma). Não haverá nenhuma compensação financeira por sua participação.

Segurança:

A Comissão de Ética do Instituto de Infectologia Emílio Ribas aprovou a realização do estudo, considerando-o ético e seguro, sendo que o mesmo será conduzido de acordo com as exigências da lei brasileira para realização de estudos clínicos.

Confidencialidade:

Os resultados do exame serão publicados mas o seu nome não será revelado.

Se você tiver dúvidas sobre o estudo entre em contato com o médico:

Dra. Paula Yurie Tanaka - Hematologista
Serviço de Hematologia - Instituto de Infectologia Emílio Ribas
Av. Dr. Arnaldo, n.165 - primeiro andar – ambulatório de especialidades– São Paulo
Telefone: (011) 3896-1388 3896-1198
24 horas 91772266
Se você tiver dúvidas sobre a ética do estudo entre em contato com:
Comitê de Ética em Pesquisa – Instituto de Infectologia Emílio Ribas
Av. Dr. Arnaldo, 165 – casa azul
Tel.: (011) 3896-1406

Se você concordar em participar do estudo será necessário um consentimento por escrito de sua parte

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, abaixo assinado, declaro pela presente que:

4. Li ou foi lido para mim, na íntegra o formulário de informações ao grupo controle, no idioma nacional que eu entendo e recebi explicações suficientes a respeito.
5. Tive oportunidade de fazer perguntas ao médico do estudo e recebi respostas satisfatórias.
6. Recebi uma cópia do formulário de informações para arquivo.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar como grupo controle do presente estudo.

São Paulo, de de 20 .

Nome e assinatura do sujeito do grupo controle

Nome e assinatura autores/pesquisador

8. Referências

1. Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma: clinical aspects. *Semin Oncol.*2000;27(4):442-53.
2. Kutok JL, Wang F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:375-404.
3. Raphael M, Said J, Bousch B, Cesarman E, Harris NL. Lymphomas associated with HIV infection. In: *World Health Organization Classification of Tumours.* Lyon:IARC press;2008:340-342.
4. Ling PD, Vilchez RA, Keitel WA, Poston DG, Peng RS, White ZS, et al. Epstein-Barr virus DNA loads in adult human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis.* 2003;37(9):1244-9.
5. Dehee A, Asselot C, Piolot T, Jacomet C, Rozenbaum W, Vidaud M, et al. Quantification of Epstein-Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. *J Med Virol.* 2001;65(3):543-52.
6. Fan H, Kim SC, Chima CO, Israel BF, Lawless KM, Eagan PA, et al. Epstein-Barr viral load as marker of lymphoma in AIDS patients. *J Med Virol.* 2005;75(1):59-69.

7. Bonnet F, Jouvencel AC, Parrens M, Leon MJ, Cotto E, Garrigue I, et al. A longitudinal and prospective study of Epstein-Barr virus load in AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Virol.* 2006;36(4):258-63.
8. Baecher Allan C, Anderson DE. Regulatory cells and human cancer. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(2):98-105.
9. Triulzi T, Tagliabue E, Balsari A, Casalini P. FOXP3 expression in tumor cells and implications for cancer progression. *J Cell Physiol.* 2012.
10. Kelley TW, Parker CJ. CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells and hematologic malignancies. *Front Biosci (Schol Ed).* 2010;2:980-92.
11. Ziegler JL, Drew WL, Miner RC, Mintz L, Rosenbaum E, Gershow J, et al. Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet.* 1982;2(8299):631-3.
12. Ziegler JL, Beckstead JA, Volberding PA, Abrams DI, Levine AM, Lukes RJ, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men. Relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med.* 1984;311(9):565-70.
13. Centers for Disease Control (CDC). Revision of the case definition of acquired immunodeficiency syndrome for national reporting--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1985;34(25):373-5.
14. Goedert JJ. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies. *Semin Oncol.* 2000;27(4):390-401.

15. Gill PS, Levine AM, Krailo M, Rarick MU, Loureiro C, Deyton L, et al. AIDS-related malignant lymphoma: results of prospective treatment trials. *J Clin Oncol.* 1987;5(9):1322-8.
16. Gisselbrecht C, Oksenhendler E, Tirelli U, Lepage E, Gabarre J, Farcet JP, et al. Human immunodeficiency virus-related lymphoma treatment with intensive combination chemotherapy. French-Italian Cooperative Group. *Am J Med.* 1993;95(2):188-96.
17. Kaplan LD. Clinical management of human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1998;(23):101-5.
18. Kaplan LD, Straus DJ, Testa MA, Von Roenn J, Dezube BJ, Cooley TP, et al. Low-dose compared with standard-dose m-BACOD chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma associated with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med.* 1997;336(23):1641-8.
19. Sparano JA, Lee S, Chen MG, Nazeer T, Einzig A, Ambinder RF, et al. Phase II trial of infusional cyclophosphamide, doxorubicin, and etoposide in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Trial (E1494). *J Clin Oncol.* 2004;22(8):1491-500.
20. Seaberg EC, Wiley D, Martínez-Maza O, Chmiel JS, Kingsley L, Tang Y, et al. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). Cancer incidence in the

multicenter AIDS Cohort Study before and during the HAART era: 1984 to 2007. *Cancer*. 2010;116(23):5507-16.

21. Kirk O, Pedersen C, Cozzi-Lepri A, Antunes F, Miller V, Gatell JM, et al; EuroSIDA Study Group. Non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood*. 2001;98(12):3406-12.
22. Besson C, Goubar A, Gabarre J, Rozenbaum W, Pialoux G, Châtelet FP, et al. Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood*. 2001;98(8):2339-44.
23. Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE) Study Group, Bohlius J, Schmidlin K, Costagliola D, Fätkenheuer G, May M, Caro-Murillo AM, et al. Incidence and risk factors of HIV-related non-Hodgkin's lymphoma in the era of combination antiretroviral therapy: a European multicohort study. *Antivir Ther*. 2009;14(8):1065-74.
24. Murooka TT, Ward SE, Fish E. Chemokines and cancer. In: *Cancer treatment and research*. Springer Science & Business Media; 2005:15-44.
25. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*. 1996;184(3):1101-9.

26. Rabkin CS, Yang Q, Goedert JJ, Nguyen G, Mitsuya H, Sei S. Chemokine and chemokine receptor gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood*. 1999;93(6):1838-42.
27. Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal*. 2004;16(11):1201-10.
28. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996;382(6593):722-5.
29. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, ET al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996;86(3):367-77.
30. Dean M, Jacobson LP, McFarlane G, Margolick JB, Jenkins FJ, Howard OM, et al. Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5-delta32 mutation. *Cancer Res*. 1999;59(15):3561-4.
31. Birx DL, Redfield RR, Tencer K, Fowler A, Burke DS, Tosato G. Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 1990;76(11):2303-10.
32. Benjamin D, Knobloch TJ, Dayton MA. Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency

syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood*. 1992;80(5):1289-98.

33. Grulich AE, Wan X, Law MG, Milliken ST, Lewis CR, Garsia RJ, et al. B-cell stimulation and prolonged immune deficiency are risk factors for non-Hodgkin's lymphoma in people with AIDS. *AIDS*. 2000;14(2):133-40.
34. Breen EC, Boscardin WJ, Detels R, Jacobson LP, Smith MW, O'Brien SJ, et al. Non-Hodgkin's B cell lymphoma in persons with acquired immunodeficiency syndrome is associated with increased serum levels of IL10, or the IL10 promoter-592 C/C genotype. *Clin Immunol*. 2003;109(2):119-29.
35. Mueller N. Overview of the epidemiology of malignancy in immune deficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1999;21 Suppl 1:S5-10.
36. Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*. 1958 ;46(197):218-23.
37. Burkitt D. A tumour syndrome affecting children in tropical Africa. *Postgrad Med J*. 1962;38:71-9.
38. Epstein MA, Barr YM. Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet*. 1964 1;1(7327):252-3.
39. Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*. 1965;121:761-70.

40. Henle W, Hummeler K, Henle G. Antibody coating and agglutination of virus particles separated from the EB3 line of Burkitt lymphoma cells. *J Bacteriol.* 1966;92(1):269-71.
41. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968;59(1):94-101.
42. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol.* 2008;18(5):305-19.
43. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH Jr. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(1):193-209.
44. Sumaya CV, Henle W, Henle G, Smith MH, LeBlanc D. Seroepidemiologic study of Epstein-Barr virus infections in a rural community. *J Infect Dis.* 1975;131(4):403-8.
45. Tierney RJ, Steven N, Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol.* 1994;68(11):7374-85.
46. Tindle BH. Reed-Sternberg Cells in Non-Hodgkin's Disease. *Calif Med.* 1972;116(5):51-2.

47. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn*. 2001;3(1):1-10
48. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis*. 2001;3(2):79-87.
49. 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;39(4):1211-6.
50. Gulley ML, Tang W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn*. 2008;10(4):279-92.
51. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med*. 1999;190(4):567-76.
52. Merlino C, Cavallo R, Bergallo M, Giacchino F, Bollero C, Negro Ponzi A, et al. Epstein Barr viral load monitoring by quantitative PCR in renal transplant patients. *New Microbiol*. 2003;26(2):141-9.
53. Schubert S, Renner C, Hammer M, Abdul-Khaliq H, Lehmkuhl HB, Berger F, et al. Relationship of immunosuppression to Epstein-Barr viral load and lymphoproliferative disease in pediatric heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27(1):100-5.

54. Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simoncini L, Sarasini A, Comoli P, et al. High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):613-9.
55. Stevens SJ, Blank BS, Smits PH, Meenhorst PL, Middeldorp JM. High Epstein-Barr virus (EBV) DNA loads in HIV-infected patients: correlation with antiretroviral therapy and quantitative EBV serology. *AIDS.* 2002 3;16(7):993-1001.
56. van Baarle D, Hovenkamp E, Callan MF, Wolthers KC, Kostense S, Tan LC, et al. Dysfunctional Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8(+) T lymphocytes and increased EBV load in HIV-1 infected individuals progressing to AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2001;98(1):146-55.
57. van Baarle D, Wolthers KC, Hovenkamp E, Niesters HG, Osterhaus AD, Miedema F, et al. Absolute level of Epstein-Barr virus DNA in human immunodeficiency virus type 1 infection is not predictive of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J Infect Dis.* 2002;186(3):405-9.
58. Stebbing J, Gazzard B, Mandalia S, Teague A, Waterston A, Marvin V, Nelson M, Bower M. Antiretroviral treatment regimens and immune parameters in the prevention of systemic AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2004;22(11):2177-83.

59. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Immunity to tumors. In: *Cellular and molecular immunology* 4th ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company. 2000.p.384-403.
60. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004;16(11):1643-56.
61. Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood*. 2006;108(3):804-11.
62. Mottet C, Golshayan D. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly*. 2007;137(45-46):625-34.
63. Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr*. 2001;13(6):533-8.
64. Chatila TA. Regulatory T cells: key players in tolerance and autoimmunity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2009;38(2):265-72.
65. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-27.
66. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;121(1):1-14.

67. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001;61(12):4766-72.
68. Knol AC, Nguyen JM, Quéreux G, Brocard A, Khammari A, Dréno B. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. *Exp Dermatol.* 2011;20(5):430-4.
69. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942-9.
70. Lee NR, Song EK, Jang KY, Choi HN, Moon WS, Kwon K, et al. Prognostic impact of tumor infiltrating FOXP3 positive regulatory T cells in diffuse large B-cell lymphoma at diagnosis. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(2):247-56.
71. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2008;93(2):193-200.
72. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971;31(11):1860-1.

73. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;328(14):1002-6.
74. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999;17(4):1244.
75. Hertzberg MS, Crombie C, Benson W, Taper J, Gottlieb D, Bradstock KF. Outpatient fractionated ifosfamide, carboplatin and etoposide as salvage therapy in relapsed and refractory non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2006;17 Suppl 4:iv25-30.
76. Dupuis J, Emile JF, Mounier N, Gisselbrecht C, Martin-Garcia N, Petrella T, et al; Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Prognostic significance of Epstein-Barr virus in nodal peripheral T-cell lymphoma, unspecified: A Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) study. *Blood*. 2006;108(13):4163-9.
77. Fong IW, Ho J, Toy C, Lo B, Fong MW. Value of long-term administration of acyclovir and similar agents for protecting against AIDS-related lymphoma: case-control and historical cohort studies. *Clin Infect Dis*. 2000;30(5):757-61.
78. Raez L, Cabral L, Cai JP, Landy H, Sfakianakis G, Byrne GE Jr, et al. Treatment of AIDS-related primary central nervous system lymphoma

with zidovudine, ganciclovir, and interleukin 2. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 20;15(8):713-9.

79. Aboulafia DM, Ratner L, Miles SA, Harrington WJ Jr; AIDS Associated Malignancies Clinical Trials Consortium. Antiviral and immunomodulatory treatment for AIDS-related primary central nervous system lymphoma: AIDS Malignancies Consortium pilot study 019. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2006;6(5):399-402.
80. Marretta L, Stocker H, Drauz D, Mueller M, Masuhr A, Dieckmann S, et al. Treatment of HIV-related primary central nervous system lymphoma with AZT high dose, HAART, interleukin-2 and foscarnet in three patients. *Eur J Med Res*. 2011;16(5):197-205.
81. Uner A, Akyurek N, Saglam A, Abdullazade S, Uzum N, Onder S, Barista I, Benekli M. The presence of Epstein-Barr virus (EBV) in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) in Turkey: special emphasis on 'EBV-positive DLBCL of the elderly'. *APMIS*. 2011;119(4-5):309-16.
82. Adam P, Bonzheim I, Fend F, Quintanilla-Martínez L. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. *Adv Anat Pathol*. 2011;18(5):349-55.
83. Straus DJ, Huang J, Testa MA, Levine AM, Kaplan LD. Prognostic factors in the treatment of human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma: analysis of AIDS Clinical Trials Group protocol 142--low-dose versus standard-dose m-BACOD plus granulocyte-

- macrophage colony-stimulating factor. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. J Clin Oncol. 1998;16(11):3601-6.
84. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, Pisa P. CD4⁺CD25^{high} T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. J Immunol. 2006;177(10):7398-405.
 85. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, Tagliabue E, Balsari A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. J Clin Oncol. 2009 10;27(11):1746-52.
 86. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, Kondoh E, Baba T, Fujii S, et al. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (Treg) cells are associated with a metastatic phenotype. Gynecol Oncol. 2010 ;116(3):556-62.
 87. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, Klasa R, Connors JM, Gascoyne RD. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. Blood. 2010;115(2):289-95.