



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LINFOMAS NÃO
HODGKIN EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS E
HIV-NEGATIVOS EM SALVADOR, BAHIA.
ASSOCIAÇÃO COM O VÍRUS EPSTEIN-BARR
E CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A OMS-2001**

TATIANA GIL ALVES PORTUGAL

**Salvador - Bahia - Brasil
2004**

8(813.8)



001917

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

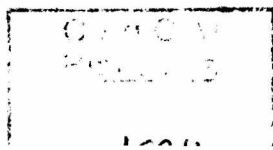
**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LINFOMAS NÃO
HODGKIN EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS E HIV-
NEGATIVOS EM SALVADOR, BAHIA.
ASSOCIAÇÃO COM O VÍRUS EPSTEIN-BARR
E CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A OMS-2001**

TATIANA GIL ALVES PORTUGAL

Orientadora: Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo

Dissertação apresentada para
a obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Portugal, Tatiana Gil Alves

P863l Estudo comparativo entre linfoma não-Hodgkin em indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos em Salvador, Bahia. Associação com o vírus Epstein-Barr e classificação segundo a OMS-2001 [manuscrito]. / por Tatiana Gil Alves Portugal. - 2004.
127 f. : il. ; 31 cm.

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

Orientação: Profa. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo. Laboratório de anatomia-patológica da Universidade Federal da Bahia.

1. Linfoma não Hodgkin. 2. HIV. 3. Vírus Epstein-Barr. I.Título.

CDU 616-006.44:616-98

LILDBI

P11L
NTV 1534
001917


616-006.44:616-98(2132)
P863.2

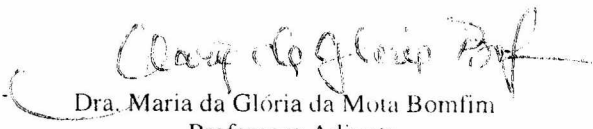
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LINFOMAS NÃO HODGKIN EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS
E HIV-NEGATIVOS EM SALVADOR, BAHIA. ASSOCIAÇÃO COM O VÍRUS EPSTEIN-BARR E
CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A OMS-2001.


TATIANA GIL ALVES PORTUGAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Carlos Roberto Brites Alves
Professor Adjunto
FAMED - UFBA


Dra. Maria da Glória da Mota Bomfim
Professora Adjunta
FAMED - UFBA


Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo
Professora Adjunta
FAMED - UFBA

À duas mulheres vencedoras,
exemplos em minha vida.

Itana Carvalho Gil da Silva

Gildete Sales Lessa

«O amor é a consequência exata e inevitável da entrega mas, se apresenta apenas para aqueles que acreditam »

Sullivan, Hübner
(médico e psicoterapeuta)

AGRADECIMENTOS

A Deus que esta em tudo

A Prof^a. Iguaracyra Araújo por ter acreditado na execução deste projeto, pela excelente orientação em todas as fases deste trabalho e pelo apoio incondicional.

Aos dedicados estudantes de medicina Daniel Freitas e Daniela Almeida Batista que desempenharam esforço conjunto na execução deste trabalho.

A Equipe da *Freie Universität* em Berlim que participou ativamente deste estudo possibilitando a realização da hibridização *in situ* e me recebendo carinhosamente quando lá estive: Dr. Michael Hümmel, *Frau* Erika Berg, *Frau* H. Lamart e Dr. Victor Luiz.

Aos colegas hematologistas, oncologistas, infectologistas e patologistas das clinicas AMO, CEHON, NOB e ONCO; Hospital Santa Isabel, HUPES, HAM, Hospital Espanhol, Hospital Português; CREAIDS e CICAN que colaboraram na identificação e no fornecimento de material de diversos pacientes que participaram deste estudo.

A meu querido Dr. Paulo César Boente, meu constante incentivador. Muito obrigada, Paulo.

A Dra. Helenemarie Schear pela revisão do projeto inicial, pela revisão do material histopatológico e da dissertação.

Ao Dr. Marco Rêgo pelas sugestões e pela colaboração na análise estatística deste trabalho.

A Ana Maria Fiscina Sampaio, bibliotecária da FIOCRUZ pela ajuda na revisão desta dissertação.

A Rósália e Iumara, da FIOCRUZ pelo apoio durante o mestrado e na impressão final da tese.

Aos colegas médicos e funcionários do NOB que me apoiaram durante a realização das matérias teóricas do mestrado e ajudaram na identificação do prontuário de diversos pacientes que participaram deste estudo.

A minhas irmãzinhas queridas: Karina, Vanessa e Tamara, meu querido sobrinho Luka e meu pai Portugal, que puderam entender e perdoar as horas que não pude estar com eles.

A minha nova família que cresce junto com esta dissertação, “lovezinho” (Steffen) e “babylinha” (Maíra). Com vocês eu me sinto realizada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

ZUSAMMENFASSUNG

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 INFECCÃO PELO HIV	18
2.1.1 Epidemiologia da Infecção pelo HIV	18
2.1.2 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV	19
2.1.3 Patogênese da Infecção pelo HIV	23
2.1.4 Manifestações Clínicas da AIDS	25
2.2 NEOPLASIA E AIDS	27
2.3 LINFOMA NÃO-HODGKIN E AIDS	27
2.3.1 Epidemiologia do LNH nos pacientes HIV-positivos	27
2.3.2 Histopatologia dos LNH em pacientes HIV-positivos	29
2.3.3 Tipos histológicos de LNH em pacientes HIV-positivos	31
2.3.3.1 LNH que também ocorrem em indivíduos imunocompetentes	31
2.3.3.2 LNH que ocorrem mais especificamente em Pacientes HIV-positivos	33
2.3.3.3 Doença Linfoproliferativa Tipo Pós –Transplante	34
2.3.4 Imunofenotipagem dos LNH em AIDS	34
2.3.5 Apresentação Clínica dos LNH em AIDS	35

2.3.6 Patogênese dos LNH em Pacientes com AIDS	37
2.3.6.1 O Papel da Imunossupressão	38
2.3.6.2 O Papel da Estimulação Crônica de Linfócitos B	39
2.3.6.3 O Papel dos Proto-Oncogenes	39
2.3.6.4 O Papel dos Genes Supressores de Tumor	41
2.3.6.5 O Papel da Desregulação de Citocinas	42
2.3.6.6 O Papel dos Vírus	42
2.3.6.6.1 HIV	42
2.3.6.6.2 Herpesvírus Humano Tipo 8 (HHV8)	43
2.3.6.6.3 Vírus Linfotrópico de Células T Humano (HTLV)	44
2.3.6.6.4 Vírus da Hepatite C (HCV)	44
2.3.6.6.5 Vírus Epstein – Barr (EBV)	44
2.4 ESTRUTURA E PADRÃO DE INFECÇÃO DO EBV EM HUMANOS	46
2.4.1 Os Genes de Latência do EBV na Resposta Imune e no Processo de Imortalização de Linfócitos	50
2.4.2 Os Genes de Latência do EBV nos LNH de Pacientes com AIDS	52
2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO EBV	54
2.6 AIDS NA ERA DA TERAPIA ANTI-RETROVIRAL DE ALTA EFICÁCIA	56
3 OBJETIVOS	58
4 JUSTIFICATIVA	59
5 MATERIAL E MÉTODOS	62
5.1 CASUÍSTICA	62
5.1.1 Seleção de Casos	62
5.1.2 Seleção dos Controles	63
5.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	63
5.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	64
5.4 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	64

5.4.1 Procedimento de Imunoistoquímica	65
5.5 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	66
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	69
6 RESULTADOS	70
6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS	70
6.2 DIAGNÓSTICO DO HIV	70
6.3 DADOS CLÍNICOS DOS LNH	71
6.3.1 Sítio de Acometimento	71
6.3.2 Estadiamento Clínico	72
6.4 DADOS LABORATORIAIS	73
6.4.1 LDH	73
6.4.2 CD4	73
6.5 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS DOS LNH	75
6.6 DETECÇÃO DA INFECCÃO PELO EBV EM LNH	77
6.6.1 Hibridização <i>In Situ</i> (EBER)	77
6.6.2 Imunoistoquímica para EBV	81
6.6.3 Padrão de Latência Viral	81
7 DISCUSSÃO	83
8 CONCLUSÕES	95
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do vírion e do genoma HIV	21
Figura 2 Representação esquemática do genoma do EBV	47
Figura 3 Aspectos histopatológicos dos LNH em pacientes HIV-positivos	76
Figura 4 Aspectos imunofenotípicos dos LNH em pacientes HIV-positivos	80
Figura 5 Detecção da infecção pelo EBV em tecido pela hibridização <i>in situ</i> e pela imunoistoquímica	82

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1 Classificação dos LNH associados ao HIV de acordo com a OMS-2001	30
Tabela 2 Anormalidades citogenéticas e associação viral nos LNH em AIDS	41
Tabela 3 Tipos de Latência do EBV	49
Tabela 4 Linfomas em AIDS: Diferentes Categorias Patológicas Baseadas na Expressão de LMP1	53
Tabela 5 Anticorpos usados na imunoistoquímica	65
Tabela 6 cDNA usados para Hibridização <i>in situ</i>	67
Tabela 7 Estadiamento clínico dos pacientes HIV positivos e negativos com LNH	73
Tabela 8 Características gerais, estadiamento clínico e dados laboratoriais dos LNH em HIV positivos	74
Tabela 9 Resultado da pesquisa para EBV nos casos de LNH em HIV positivos	78
Tabela 10 Dados dos pacientes com LNH do grupo controle HIV negativos	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Distribuição de casos de LNH em pacientes HIV positivos e negativos por sítio de acometimento	72
Gráfico 2 Distribuição dos subtipos histológicos dos LNH em pacientes HIV positivos e negativos em porcentagem	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

AMO: Assistência Médica Oncológica

ATL: Leucemia/ Linfoma de células T do adulto

CCR5: Receptor de Citocina Quimiotática 5

CDC: *Center of Disease Control*

CEHON: Centro de Hematologia e Oncologia da Bahia

CICAN: Serviço Estadual de Oncologia

CXCR4: Receptor de Citocina Quimiotática 4

DLTPT: Doença Linfoproliferativa Tipo Pós Transplante

EBV: Vírus Epstein–Barr

EBV+: Positivo para o EBV

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assays*

EUA: Estados Unidos da América

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos

HAART: Terapia Anti-retroviral de Alta Eficácia

HAM: Hospital Aristides Maltez

HCRS: Hospital Central Roberto Santos

HCV: Vírus da Hepatite C

HHV 8: Herpes Vírus tipo 8

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HIV+: Com Sorologia Positiva para HIV

HIV-: Com Sorologia Negativa para HIV

HUPES: Hospital Universitário Professor Edgard Santos

IHQ: Imunoistoquímica

LAGC: Linfoma Anaplásico de Grandes Células

LB : Linfoma de Burkitt

LCL : Linhagens de Células Linfoblásticas

LDGCB : Linfoma Difuso de Grandes Células B

LDGCB-C: Linfoma Difuso de Grandes Células B Variante Centroblástica

LDGCB-I: Linfoma Difuso de Grandes Células B Variante Imunoblástica

LDH: Desidrogenase Láctica Sérica

LEP: Linfoma Efusional Primário

LNH: Linfoma não-Hodgkin

LPB: Linfoma Plasmoblástico

NCI: *National Cancer Institute*

NOB: Núcleo de Oncologia da Bahia

ONCO: Sociedade de Oncologia da Bahia

SNC: Sistema Nervoso Central

TNF: Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE LINFOMAS NÃO HODGKIN EM INDIVÍDUOS HIV-POSITIVOS E HIV-NEGATIVOS EM SALVADOR, BAHIA: ASSOCIAÇÃO COM O VÍRUS EPSTEIN-BARR E CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A OMS-2001. [INTRODUÇÃO] Diferentes aspectos clínico-epidemiológicos e patológicos têm sido descritos em neoplasias ocorrendo em pacientes HIV positivos (HIV+). Linfomas fazem parte deste grupo, sendo o Linfoma Não-Hodgkin (LNH) a segunda neoplasia mais comum em pacientes com AIDS. Porém, tem sido observada uma grande variação geográfica na frequência de LNH em pacientes HIV-positivos, bem como na distribuição dos diferentes subtipos histológicos. [OBJETIVOS] Desde que pouco se sabe sobre LNH em pacientes HIV+ no nosso meio, realizamos este trabalho para: a) classificar de acordo com a OMS os LNH ocorrendo nestes pacientes, comparando com LNH em pacientes HIV-negativos (HIV-) em Salvador-Bahia; b) investigar associação com infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) no tecido neoplásico destes pacientes. [MATERIAL E MÉTODOS] Estudo caso-controle retrospectivo. Foram levantados dados clínicos e epidemiológicos de casos de LNH diagnosticados em Salvador entre Janeiro de 1998 e Dezembro de 2002. Para tanto foram revisados os prontuários dos pacientes com LNH e/ou realizadas entrevistas com médicos envolvidos no atendimento em serviços de referência no atendimento de LNH e/ou AIDS em Salvador. Foram obtidos 17 casos e 30 controles. Os LNH foram submetidos a revisão histológica, imunoistoquímica e classificados segundo a OMS-2001. A infecção pelo EBV foi detectada por técnicas de imunoistoquímica e hibridização *in situ*. [RESULTADOS] A média de idade dos LNH nos pacientes HIV + foi de 41 (+/-8,5) anos, inferior ao do grupo controle ($p=0,01$). O acometimento primário de sítios extra-nodais foi mais freqüente nos casos (12/17) que nos controles (10/30) ($p=0,004$). Os LNH em pacientes HIV+ foram exclusivamente de fenótipo B e de alto grau de malignidade, enquanto que no grupo controle houve linfomas com fenótipo B e T e graus histológicos variáveis. O percentual de casos positivos para EBV foi significativamente maior nos casos que nos controles ($p=0,002$). [CONCLUSÃO] Os LNH em pacientes HIV+ têm aspectos clínicos e histopatológicos distintos dos descritos na população geral: apresentam alto grau de malignidade, têm tendência à manifestação primária em sítios extra-nodais e exibem uma alta associação com a infecção pelo EBV. É possível que o EBV desempenhe um papel importante no desenvolvimento de alguns dos subtipos de LNH em pacientes HIV +. Porém, há necessidade de estudo sistemático prospectivo para melhor caracterização destes linfomas. [PALAVRAS-CHAVE] Linfoma Não Hodgkin, HIV, Vírus Epstein-Barr

ABSTRACT

COMPARATIVE STUDY BETWEEN THE NON-HODGKIN LYMPHOMA IN HIV-POSITIV PEOPLE AND HIV-NEGATIV ONES IN SALVADOR, BAHIA. ASSOCIATION WITH THE EPSTEIN-BARR VIRUS AND CLASSIFICATION ACCORDING TO THE WHO-2001. [INTRODUCTION] Distinct clinical-epidemiologic and pathologic aspects have been described in neoplastic diseases occurring in HIV-positive (HIV+) patients. Lmphomas are part of this group, and Non-Hodgkin's Lymphoma (NHL) is the second most common cancer in AIDS. However, the frequency of LNH may be highly variable in different geographic areas, not only in HIV+ patients but also in immunocompetent patients. [OBJECTIVES] As there is little information about lymphomas in HIV+ patients in Salvador, Brazil, we proposed to study and classify according to OMS, LNH in HIV+ patients and compare their characteristic with lymphomas occurring in HIV-negative (HIV-) patients in Salvador-Bahia-Brazil. We also investigated the presence of the Epstein-Barr virus (EBV) infection in tumor tissue of these patients. [MATERIAL AND METHODS] A retrospective case-control trial. We revised the files of NHL patients and/or interviewed medical doctors involved in the treatment of AIDS and NHL in several clinics and hospitals in Salvador. We studied 17 HIV+ NHL (cases) and 30 HIV- NHL (controls). Paraffin sections of neoplastic tissue were analyzed by immunohistochemistry and classified according the OMS-2001. The detection of EBV infection was performed using *in situ* hybridization and immuohistochemistry. [RESULTS]. The LNH in HIV+ patients occurred in younger people when compared with the control group ($p=0,01$). The primary involmnet of extra-nodal sites was more frequent among HIV+ patients than in HIV- patients ($p=0,004$). NHL occurring in HIV+ patients were high grade lymphomas exclusively of B-cell imunophenotype. In the HIV- group there were variable histological grade and imunophenotype (T, B or null). The frequency of EBV infection in NHL was significantly higher in the HIV+ lymphomas ($p=0,002$). [CONCLUSIONS] NHL in HIV+ pacients has distinct histological and clinical aspects. These LNH are of high grade of malignance, have a tendency of primary extra-nodal presentation and a high association with EBV infection. EBV infection may be related to the development of some subtypes of LNH by HIV+ patients. However, it is necessary to study a larger series of cases for a better characterization of the NHL in the HIV+ patients. [KEY-WORDS] Non-Hodgkin Lymphoma, HIV, Epstein - Barr virus.

ZUSAMMENFASSUNG

VERGLEICHENDE STUDIE ZWISCHEN NON-HODGKIN LINFOME IN HIV-POSITIVEN UND HIV-NEGATIVEN MENSCHEN IN SALVADOR, BAHIA: UNTERSUCHUNG DER MÖGLICHEN VERBINDUNG MIT DEM EPSTEIN-BARR VIRUS UND KLASSIFIZIERUNG GEMÄß WHO-2001.[EINFÜHRUNG] Verschiedene klinische, epidemiologische und pathologische Aspekte werden in den neoplastischen Krankheitsbildern beschrieben die in HIV-positiven (HIV+) Patienten auftreten. Die Lymphome sind ein Teil dieser Gruppe und die non-Hodgkin Lymphome (NHL) sind die zweithäufigsten Krebserkrankungen an AIDS. Wegen des hohen Auftretens dieser Krankheit, sind einige Subtypen von NHL, die sich in HIV+ Menschen zeigen, als Diagnosekriterien von AIDS inbegriffen. Es ist bekannt, dass einige klinische Erscheinungen von AIDS, die einige Aspekte und die Häufigkeit der neoplastischen Krankheiten beinhalten, eine große geographische Variabilität haben. [ZIEL] Da es nur wenige Informationen über das Auftreten von NHL in HIV+ Patienten in unserem Land gibt, haben wir diese Forschung mit den folgenden Zielen entwickelt: a) Kennzeichnung und Klassifizierung der NHL, die in diesen Patienten auftraten, gemäß der WHO und Vergleich dieser mit einer Gruppe von HIV negativen Patienten (HIV-) in Salvador-Bahia-Brasilien; b) Untersuchung des Vorhandenseins des Epstein-Barr Virus (EBV) im Tumorgewebe dieser Patienten. [MATERIAL UND METHODEN] Für diesen Zweck haben wir: a) die Krankenakten der NHL Patienten revidiert und/oder Interviews mit den behandelnden Ärzten beider Krankheiten in verschiedenen Kliniken und Krankenhäusern gemacht; b) histologische und immunhistochemische Analysen des parafinierten Tumorgewebes der mit NHL Diagnostizierten gemacht und diese gemäß der WHO-2001 klassifiziert; c) alle parafinierten Tumorgewebe in die In-situ-Hybridisierung und immunhistochemische gegeben, um sie dort auf EBV-Antigene zu untersuchen. [ERGEBNISSE] Wir konnten NHL in 17 HIV+ finden und mit 31 NHL in HIV- Patienten vergleichen. Die meisten der HIV+ Patienten mit NHL waren junge männliche Personen, die Mehrheit im fortgeschrittenen Stadium und mit histologischen Subtypen von aggressivem klinischen Verhalten, sämtliche mit einem B-Zellen-Phänotyp. Die extranodale Ersterkrankung war häufig und die Mehrheit der Patienten hatten $CD4 < 200/m^3$. Der Prozentsatz der EBV-positiven in den NHL war signifikant höher in HIV+ Patienten als in HIV- ($p=0,001$). [ERGEBNISSE] Wir schließen, dass die NHL in HIV+ Patienten einen unterschiedlichen klinischen Aspekt haben als die normale Population. Sie haben auch aggressive Tumore, die Tendenz des extranodalen Auftretens und eine hohe Verbindung zu EBV-Infektionen. Wir hoffen mit dieser Arbeit einen Beitrag zu leisten für eine bessere Charakterisierung der NHL-Patienten bei HIV+ Menschen in unserer Stadt. [SCHLÜSSELBEGRIFFE] Non-Hodkin-Lymphome, HIV, Epstein-Barr-Virus

CRONOGRAMA

- a data de início corresponde ao dia da aprovação da capes

	X Mês	X Mês	X a Y Mês	X a Y Mês	X a Y Mês	X a Y Mês	X Mês	X Mês	X Mês	Obs
Abertura das Inscrições										
Seleção dos Candidatos										
Oferecimento das Disciplinas (Ministradas na Instituição Receptora Com Docentes da UFRGS)										
Disciplina/Estágio na UFRGS										
Projeto de Pesquisa/Dissertação										
Elaboração da Dissertação										
Defesa da Dissertação										
Avaliação Final do MINTER										
Relatório Final para a CAMPG										

AIDS - os LNH podem ser a primeira manifestação clínica de HIV, e alguns subtipos histológicos são consideradas condições clínicas que definem o diagnóstico da AIDS nos pacientes HIV-positivos (CDC, 1991).

Algumas particularidades são encontradas nos LNH observados em pacientes HIV-positivos. A maioria dos pacientes apresenta-se em estágios clínicos mais avançados, possui doença volumosa e sintomas sistêmicos, sendo frequente o envolvimento primário de sítios extracranianos.

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 60 milhões de pessoas no mundo já se infectaram com o vírus HIV. A AIDS representa atualmente a quarta causa de morte na humanidade. Até o final de 2002 existiam 42 milhões de pessoas vivendo com AIDS no mundo; 1,5 milhões na América Latina (UNAIDS, 2002). Dos 257.771 casos notificados no Brasil até dezembro de 2002, 9% pertenciam a região nordeste, um quarto destes provenientes da Bahia, dos quais, 61,5% diagnosticados em Salvador (DADOS, 2002).

Os pacientes infectados pelo HIV têm um risco bastante aumentado de apresentarem neoplasias malignas, incluindo linfomas (DAL MASO, et al., 2001; GOEDERT, 2000). A frequência aumentada de linfoma não-Hodgkin em indivíduos infectados com HIV, pertencentes a vários grupos de risco e diferentes faixas etárias, é observada em todo o mundo (GAIL, et al., 1991; DAL MASO, & FRANCESCHI, 2003). O risco de LNH em pacientes com AIDS em países ocidentais é cerca de 150-250 vezes o da população geral. (SWERDLOW, 2003). Apesar de ocorrerem classicamente como uma manifestação tardia da AIDS, os LNH podem ser a primeira manifestação clínica desta doença, e alguns subtipos histológicos são considerados condições clínicas que definem o diagnóstico da AIDS nos pacientes HIV- positivos (CDC, 1992).

Algumas particularidades são encontradas nos LNH observados em pacientes HIV-positivos. A maioria dos pacientes apresenta-se em estágios clínicos mais avançados, possui doença volumosa e sintomas sistêmicos, sendo freqüente o envolvimento primário de sítios extranodais.

A patogênese do LNH relacionado a AIDS é multifatorial. Um dos possíveis fatores implicados na gênese desta neoplasia neste grupo de pacientes, é a redução na resposta T citotóxica específica para vírus (CARMICHAEL, et al., 1993). As infecções pelo HHSV-8 e mais frequentemente pelo EBV têm sido relacionadas à patogênese de LNH em pacientes HIV-positivos (NADOR, 1996; AMBINDER, 2001). O EBV tem a habilidade de estabelecer infecções de longa duração em humanos, caracterizadas pela expressão de um número limitado de proteínas virais codificadas pelos genes de latência viral. Algumas proteínas virais de latência do EBV foram analisadas e mostraram-se importantes no processo de immortalização de linfócitos e como oncogenes, potencialmente relacionados ao aparecimento de neoplasias.

A hibridização *in situ* com sonda de RNA é um método sensível para detecção do EBV em material parafinado e tem a vantagem de localizar o vírus diretamente no tecido analisado. A imunistoquímica para os antígenos LMP-1 e EBNA-2 do EBV, apesar de não ser um método de escolha para detecção do EBV, é usada de rotina para detectar o tipo de latência viral (GULLEY, 2001).

Neste trabalho identificamos os casos de LNH ocorrendo em indivíduos HIV-positivos em Salvador, Bahia, Brasil ocorrendo no período de janeiro de 1998 a março de 2003; classificamos tais LNH de acordo com a classificação da OMS-2001; verificamos alguns dados clínicos e laboratoriais de relevância nestes pacientes como idade, sexo, estadiamento clínico, valores de desidrogenase láctica (LDH) e CD4; pesquisamos a presença de EBV no tecido tumoral dos LNH; estabelecemos o tipo de latência viral através da imunistoquímica direcionada para os antígenos de latência do EBV (LMP 1 e EBNA 2) e por fim comparamos os dados obtidos destes pacientes com um grupo controle de LNH ocorrendo em pacientes HIV-negativos diagnosticados no mesmo período em Salvador.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÃO PELO HIV

2.1.1 Epidemiologia da Infecção pelo HIV

A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é a manifestação mais grave e avançada da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Esta síndrome foi reconhecida pela primeira vez em 1981 nos Estados Unidos. Na ocasião foram relatados os primeiros casos, que ocorreram em homossexuais masculinos, previamente saudáveis, residentes em Los Angeles, Califórnia e na cidade de Nova Iorque. Estes pacientes desenvolveram pneumonia por *Pneumocystis Carinii* e/ou Sarcoma de *Kaposi* (GOTTLIEB, et al., 1981).

A infecção pelo HIV atinge indivíduos em todos os continentes do mundo (UNAIDS, 2002). A principal via de transmissão é a sexual e os indivíduos em idade reprodutiva são os mais acometidos. No início da epidemia, a infecção pelo HIV acometia principalmente indivíduos com práticas homossexuais ou bissexuais. Mais recentemente, tem sido observada uma tendência de acometimento, em proporções crescentes, de heterossexuais, sobretudo mulheres (NEAL, et al., 1997). Outras vias de transmissão são também possíveis. A transmissão por via parenteral decorre da exposição a sangue contaminado pelo HIV. Os exemplos mais representativos desta forma de transmissão são a transfusão de sangue e produtos do sangue (CURRAN, et al., 1984) e uso de agulhas contaminadas por usuários de drogas injetáveis (SCHOENBAUM, et al., 1989). A transmissão vertical perinatal é a responsável pela maioria dos casos pediátricos de AIDS (DOUGLAS, et al., 1992).

Desde o início da epidemia da AIDS o número de pessoas infectadas pelo HIV vem crescendo, estima-se que cerca de 60 milhões de pessoas já se infectaram. No ano de 2002 foram cinco milhões de novos casos registrados no mundo, cerca de 150.000 na América Latina. Neste mesmo ano, existiam no planeta, 42 milhões de pessoas vivendo com AIDS; 1,5 milhões destas, na América Latina. HIV/AIDS é atualmente a quarta causa de morte no mundo. Até o final de 2002 ocorreram cerca de 3,1 milhões de mortes por AIDS, 60.000 destas, na América do Sul (UNAIDS, 2002).

Os primeiros casos de AIDS no Brasil foram detectados no início da década 80 nas cidades de São Paulo e Rio de Janeiro. Dados do Ministério da Saúde-Boletim Epidemiológico da Coordenação Nacional de DST e AIDS apontam para a existência no Brasil, no ano de 2000, de cerca de 600 mil portadores do vírus HIV em indivíduos entre 15 e 49 anos de idade. A faixa etária mais acometida pela AIDS no Brasil é de indivíduos entre 25 a 39 anos de idade. A proporção de casos, entre homens e mulheres desde os anos 80 até a atualidade é cerca de 2,5: 1, no entanto, se analisarmos os casos ano a ano, veremos uma tendência marcante de aumento de casos em mulheres ao longo do tempo (DADOS, 2002). Desde o início da década de 80 até dezembro 2002 foram notificados 257.771 casos de AIDS no Brasil. Destes, 23.208 casos (9,0%) foram provenientes da região nordeste. Nesta região, a Bahia foi responsável por 5.423 notificações (23,3%); 3.330 (61,4%) destas, na cidade de Salvador (DADOS, 2002).

2.1.2 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV

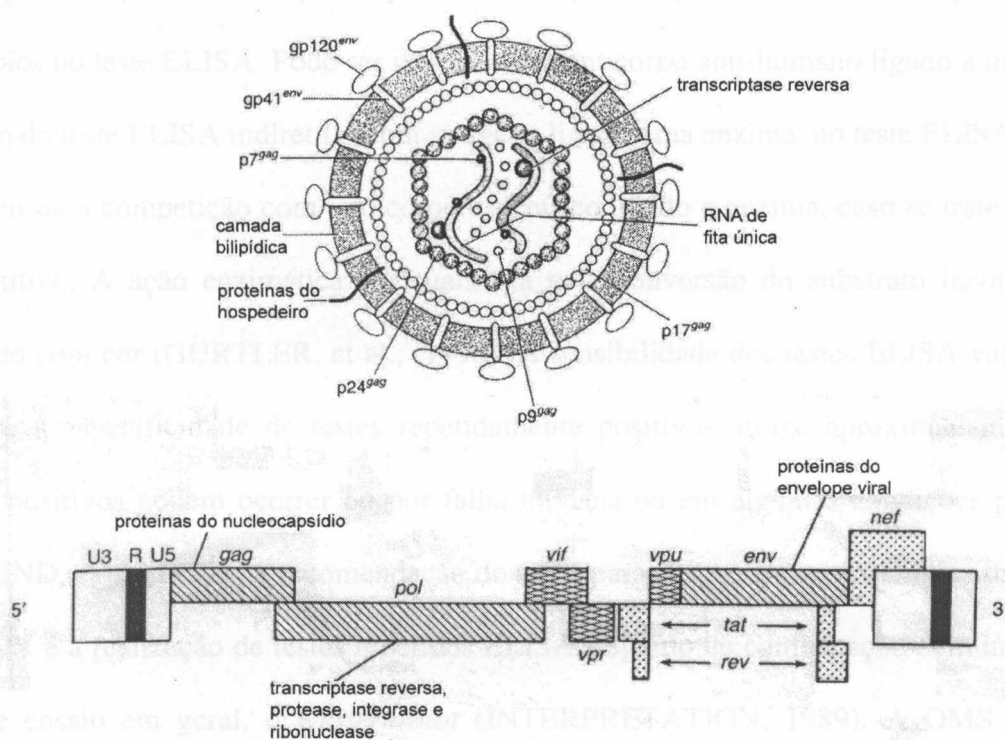
Dois anos após o relato dos primeiros casos de AIDS, foi isolado o vírus responsável por esta doença (GALLO, et al., 1984). Este vírus, inicialmente denominado de HTLV-III, hoje é chamado de HIV-1. Em 1986 foi descoberto na África, o vírus HIV-2 caracterizado por possuir organização genética homóloga, modo de transmissão e quadro clínico muito similar

ao primeiro (CLAVEL, et al., 1986). O HIV-2 é encontrado quase exclusivamente nas regiões Centro-Norte e Noroeste da África e Ásia enquanto o HIV-1 é difundido em todo o mundo sendo responsável por 99% das infecções.

HIV-1 e HIV-2 são retrovírus, membros da família *Retroviridae* e da subfamília dos lentivírus. Possuem três genes essenciais denominados *env*, *gag* e *pol* que codificam respectivamente, o envelope viral, os peptídeos do nucleocapsídeo e a enzima transcriptase reversa. Eles possuem também seis genes regulatórios (*nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpu*, *vpr*). No envelope viral destacam-se as glicoproteínas (*gp*) derivadas da *gp* 160; a *gp*120 e *gp* 41. O núcleo viral é constituído pelas proteínas p24, p17, p9 e p7 e contém duas cópias de RNA de fita única (**Figura 1**). A transcriptase reversa e a integrase, proteínas presentes no núcleo viral, são responsáveis pela transcrição da sequência sense do RNA em DNA e pela integração deste, ao genoma da célula hospedeira (GREENE, et al., 1991).

Existem três grupos de vírus HIV-1 divididos com base em análises filogenéticas, o grupo M (*major*), o grupo O (*outlier*) e o grupo N (*new* ou *non-M-non O*). O grupo O, tem homologia de 55 a 70% com outros subtipos do HIV-1 e é mais encontrado na região oeste e central da África. O grupo N foi descrito em número limitado de isolados provenientes dos Camarões. O grupo M, por sua vez, compreende diferentes subtipos ou cepas, além de algumas formas recombinantes e se distribui de maneira mais homogênea no mundo (COHEN, O, et al., 2000). No Brasil tem sido demonstradas a maioria destes subtipos e algumas formas recombinantes, sendo o subtipo B o mais predominante no nosso meio (MORGADO, et al., 2002; GALVÃO-CASTRO et al., 1996). Em estudo recente, analisando-se amostras de 149 indivíduos HIV positivos no estado do Ceará, verificou-se que os subtipos mais comuns eram o subtipo B, F e recombinantes B/F (GADELHA, et al., 2002).

Figura 1: Representação esquemática do virion e do genoma HIV



Fonte: adaptada de Greene (1991)

A infecção pelo HIV é diagnosticada pela detecção do próprio vírus, genoma viral, antígenos virais ou anticorpos anti-HIV, específicos para o vírus (GÜRTLER, et al., 1996). Em 1985 foram disponibilizados os primeiros testes sorológicos para detecção do HIV (método de ensaio enzimático ELISA). Os ensaios de primeira geração para detecção do HIV utilizavam originalmente lisados virais como antígenos. A utilização de proteínas e peptídeos virais recombinantes nos testes ELISA de segunda geração, resultou num aumento da sensibilidade e especificidade do teste. A inclusão de antígenos do grupo O nos testes ELISA de terceira geração, a partir de 1994, aumentou a sensibilidade para detecção de cepas variantes (ZAAIJER, et al., 1992). Os anticorpos para o HIV geralmente são detectados 6-8 semanas

após a infecção e persistem ao longo da vida do indivíduo infectado. Por este motivo os testes de ELISA são considerados como primários na detecção de infecção já estabelecida pelo HIV. Tais testes utilizam micro placas contendo antígenos virais imobilizados aos quais se ligam os anticorpos do paciente. A presença de anticorpos reagentes é detectada por diferentes princípios no teste ELISA. Pode ser utilizado um anticorpo anti-humano ligado a uma enzima no caso do teste ELISA indireto ou um antígeno ligado uma enzima, no teste ELISA de duplo antígeno ou a competição com anticorpo específico ligado a enzima, caso se trate de ELISA competitivo. A ação enzimática é visualizada pela conversão do substrato incolor em um derivado com cor (GÜRTLER, et al., 1996). A sensibilidade dos testes ELISA vai de 93% a 100% e a especificidade de testes repetidamente positivos atinge aproximadamente 99%. Falsos positivos podem ocorrer ou por falha humana ou em algumas condições patológicas (BYLUND, et al., 1992). A recomendação do CDC para o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV é a realização de testes repetidos ELISA, seguido de confirmação com um segundo tipo de ensaio em geral, o *western-blot* (INTERPRETATION, 1989). A OMS reconhece como equivalente, o diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV estabelecido através da utilização de dois testes ELISAs contendo diferentes antígenos e baseados em diferentes princípios, como demonstrado num estudo em população de doadores de sangue no Brasil (CARVALHO, et al., 1996).

O teste mais comum para confirmação de testes ELISAs positivos, é o *immunoblot* ou *Western Blot* o qual se tornou o teste ouro para este fim (GÜRTLER, et al., 1996). O teste é realizado a partir da incubação do soro do paciente com proteínas virais separadas por eletroforese e dispostas num papel de nitrocelulose. Os anticorpos humanos direcionados às proteínas virais do HIV quando presentes, podem ser identificados por um anticorpo humano ligado a enzima de forma semelhante ao método ELISA. O teste é considerado positivo

(conforme critérios pré-estabelecidos pelo CDC) quando estão presentes pelo menos duas das três bandas p24, gp41 e gp120/160 (INTERPRETATION, 1989).

2.1.3 Patogênese da Infecção pelo HIV

O primeiro alvo da infecção pelo HIV são as células de Langerhans, células dendríticas tissulares encontradas, por exemplo, no epitélio cervico vaginal. Tais células interagem com os linfócitos T CD4 positivos (+) e vão para tecidos mais profundos. No segundo dia de infecção, os vírus podem ser detectados nos linfonodos de drenagem. (KAHN & WALKER, 1998).

Os linfócitos T CD 4 + são as células preferencialmente infectadas pelo HIV. Existe uma alta afinidade entre a gp120 do envelope do HIV com a molécula CD4 de superfície presente nos linfócitos T auxiliares, células macrofágicas, células gliais e oligodendrócitos (WARD, et al., 1987). O HIV penetra na célula interagindo também com co-receptores na superfície da célula hospedeira, identificados como receptores de citocinas quimiotáticas: CXCR4 e CCR5 (DENG, et al., 1996; FENG, et al., 1996). O DNA pró-viral é sintetizado pela ação da transcriptase reversa a partir do RNA viral e o DNA viral de dupla hélice, desloca-se para o núcleo onde se incorpora ao genoma celular pela ação de uma integrase viral (GREENE, et al., 1991). Após a entrada na célula, HIV-1 pode estabelecer infecção latente persistente sem replicação ou pode iniciar a replicação viral.

No curso da infecção pelo HIV existe um estado de ativação imune resultante de estímulos antigênicos induzidos pelo próprio HIV, pelas infecções oportunistas associadas e por outros estímulos inflamatórios, levando a ativação tanto de macrófagos, linfócitos e a indução de citocinas pró-inflamatórias, além da expressão de co-receptores por células mononucleares

(LAWN, et al., 2001). Tal ativação por sua vez, atua modulando a susceptibilidade das células à infecção pelo HIV e facilitando a replicação viral já que, o ciclo replicativo do HIV é mais eficaz em células linfóides ativadas (FAUCI, et al., 1996).

O vírus HIV induz extenso dano ao sistema imune por mecanismo direto relacionado ao vírus e mecanismos patogênicos indiretos. Tanto a imunidade celular quanto a humoral são incapazes de controlar a infecção a qual resulta por fim, em anormalidades funcionais em todos os tipos celulares envolvidos na resposta imune (DE MILITO, 2004). O desenvolvimento de linfocitopenia característico da progressão da doença em indivíduos HIV+ é o resultado da morte celular induzida por este vírus; da destruição das células infectadas; da indução de apoptose tanto em células infectadas quanto em células não infectadas; além da regeneração linfóide prejudicada tanto ao nível de maturação no timo quanto na hematopoiese medula óssea (MACIEJEWSKI, et al., 1994). Observa-se um complexo padrão de mudanças graduais na composição dos subtipos de células T com depleção tanto de linfócitos T auxiliares (CD 4 positivos) e linfócitos T supressores (CD8 positivos), além de linfócitos T de memória (CLARK, et al., 1999). A depleção e disfunção de linfócitos T CD4 explicam a maioria das conseqüências patológicas da infecção pelo HIV. A resposta dos linfócitos auxiliares sofre alteração qualitativa com mudança progressiva de um padrão de resposta predominantemente T_H1 para resposta tipo T_H2 (CLERICI & SHEARER, 1993). A redução progressiva no número e função das células T-auxiliadoras CD4 leva diminuição da resposta celular e diminuição da resposta a antígenos com conseqüente falha na resposta imune humoral. (COHEN, O., et al., 1999).

O alto índice de mutação do HIV somado a habilidade deste vírus de induzir a uma sub-regulação na expressão de moléculas de histocompatibilidade tipo I nas células infectadas, permite que o vírus escape do reconhecimento pelas células T CD 8 positivas (GULZAR &

COPELAND, 2004). A desregulação no número e na função dos linfócitos T CD 8 positivos induzidas pelo HIV, ocasiona um estado de anergia com perda da atividade citotóxica destas células não só contra o vírus HIV, mas também contra o vírus Epstein–Barr e outros patógenos. (CARMICHAEL, et al., 1993).

Os linfócitos B são também alvo de danos induzidos pelo HIV e mostram ao longo da infecção por este vírus alterações fenotípicas e funcionais em paralelo a hiperativação policlonal de células B, hipergamaglobulinemia e hiperplasia de folículos linfóides. As células NK mostram redução na habilidade de destruir células alvo (ULLUM, et al., 1995). Os monócitos-macrófagos apresentam anormalidades funcionais: defeito na captação de antígenos; no dano oxidativo induzido por estas células e na quimiotaxia; diminuição da expressão de moléculas MHC classe II; redução da secreção de IL-12; aumento da secreção de IL-10 (POLYAK, et al., 1997). A função dos neutrófilos encontra-se diminuída durante todo o curso da infecção pelo HIV (ELBIM, et al., 1995).

2.1.4 Manifestações Clínicas da AIDS

A história natural da infecção pelo HIV compreende os seguintes eventos: a transmissão viral; a síndrome retroviral aguda que ocorre em média 4 a 6 semanas após a infecção pelo HIV e é caracterizada por quadro clínico similar a mononucleose infecciosa; a soroconversão que geralmente coincide com a fase aguda e que é definida pelo aparecimento de anticorpos específicos contra o HIV; o período de latência clínica com ou sem linfadenopatia generalizada persistente; a infecção sintomática precoce conhecida anteriormente como Complexo Relacionado a AIDS; a doença propriamente dita, AIDS; e a infecção avançada pelo HIV, cuja característica é CD4 abaixo de $50/\text{mm}^3$ (VERGIS & MELLORS, 2000). A linfadenopatia persistente generalizada é caracterizada pela presença de linfadenopatia

generalizada por pelo menos três meses, no mínimo dois sítios diferentes extra-inguinais, na ausência de doença associada que possa levar ao aparecimento de adenomegalias. Na biópsia destes linfonodos, a depender da fase, o achado histológico pode ser de hiperplasia folicular, involução de folículos linfóides ou uma mistura de hiperplasia e involução de folículos (BRYNES, et al., 1983).

As manifestações clínicas da AIDS são decorrentes de três mecanismos fisiopatológicos principais: 1) Autoimunidade, 2) Disfunção Neurológica e 3) Imunodeficiência. A marca da infecção pelo HIV é a deterioração do sistema imune levando a um estado de imunodeficiência profunda como o próprio nome sugere: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. A imunodeficiência proporciona o aparecimento de uma variedade de doenças infecciosas e neoplásicas (CHAISON, et al., 2000). Vários órgãos e sistemas do organismo podem ser afetados, levando a diferentes apresentações clínicas e anormalidades histopatológicas. Em nosso meio, o estudo de 130 biópsias hepáticas de pacientes com diagnóstico de AIDS mostrou presença de esteatose hepática em 43,4%; inflamação crônica granulomatosa, com ou sem necrose em 22,3%; deposição de pigmento enegrecido em 16,1%; necrose em 7,7% e infiltração neoplásica em 1,6% (FONSECA JUNIOR, 1998). As manifestações neurológicas da AIDS podem decorrer da ação direta do vírus HIV ou do resultado de infecções e neoplasias. A análise de 62 encéfalos de pacientes com AIDS necropsiados no período de 1991 e 1999 em Salvador-Bahia, mostrou diversas características neuropatológicas. Em 93,5% dos casos foram observadas alterações histopatológicas isoladas ou combinadas, sendo: 58% infecções oportunistas encefálicas; 9,7% leucoencefalopatias/encefalites, por lesão direta do vírus no SNC; 6,4% linfomas e 42% lesões inespecíficas (SANTOS, 2001).

2.2 NEOPLASIA E AIDS

Pacientes com infecção pelo HIV têm um risco bastante aumentado de apresentarem neoplasias malignas (DAL MASO, et al., 2001; SWERDLOW, 2003). Quatro tipos de neoplasias são atualmente incluídas nos critérios diagnósticos de AIDS do *Center of Disease Control* de 1993 (CDC, 1992): sarcoma de Kaposi, linfoma não Hodgkin, linfoma primário do cérebro e carcinoma de colo uterino invasivo. Vários outros tipos de câncer, no entanto, têm sua incidência aumentada na população HIV-positiva como: o câncer de lábio, câncer de pulmão, câncer de ânus, câncer de conjuntiva ocular, linfoma de Hodgkin, mieloma múltiplo e leucemia (VOLM & VON ROENN, 1996).

2.3 LINFOMA NÃO HODGKIN E AIDS

2.3.1 Epidemiologia do LNH nos Pacientes HIV-positivos

Cerca de dois anos após a descrição da AIDS, foi relatado o primeiro caso de LNH em um homossexual (DOLL, & LIST, 1982). A este caso inicial, seguiu-se alguns meses depois, a publicação de mais quatro casos de linfoma tipo Burkitt em homossexuais imunocomprometidos (ZIEGLER, et al., 1982). Dois anos após, mais 90 casos foram descritos, estabelecendo-se uma relação mais clara entre LNH e AIDS (ZIEGLER, et al., 1984). A frequência aumentada de linfoma não-Hodgkin em indivíduos infectados com HIV, pertencentes a vários grupos de risco e diferentes faixas etárias, é observada em todo o mundo (GAIL, et al., 1991; DAL MASO, & FRANCESCHI, 2003). Em países desenvolvidos foram realizados estudos cruzando-se os registros de AIDS e os registros de câncer com o objetivo de estimar o risco de linfoma e outras neoplasias em pessoas com AIDS. Nos EUA verificou-se que existiam 2.156 casos de LNH (4,3%) dentre 51.033 pessoas com AIDS em sete regiões

americanas; quando a pesquisa foi estendida para mais 4 regiões este número subiu para 3.344 casos. O risco relativo de LNH dois anos após o diagnóstico de AIDS neste país foi de 73 (95%CI: 70-75), (GOEDERT, et al., 1998; FRISCH, et al., 2001). Calcula-se que cerca de 10% de todos os LNH nos EUA sejam relacionados a AIDS (BIGGAR, & RABKIN, 1992). Num estudo retrospectivo baseado no registro de *New South Wales* na Austrália a comparação da incidência de LNH na população geral com a população HIV-positiva mostrou que o risco de LNH estava aumentado 97,3 vezes nas pessoas HIV+ (GRULICH, et al., 1999). Na Itália, um dos países com maior prevalência de AIDS na Europa, foi descrito que 8% do total de LNH se correlacionavam a AIDS (DAL MASO, et al., 2001). Em países em desenvolvimento os dados são escassos e a maioria das informações sobre LNH e HIV vêm de estudos africanos. A incidência anual de LNH em um estudo da Uganda foi de 3: 100.000 no início de 1990 e 6:100.000 entre 1995-1997 (PARKIN, et al., 1999). Nesta mesma região, um outro estudo de caso-controle, mostrou um risco aumentado de LNH em indivíduos infectados pelo HIV 6.2 (95%CI: 1,9-19.9) (NEWTON, et al., 2001). Em Zimbábue, uma das regiões do Sub-Saára mais afetadas pela AIDS, a incidência foi de 4:100.000 no período de 1990 a 1995 segundo dados do registro de câncer local (CHOKUNONGA, et al., 1999). Em Ruanda o risco relativo de LNH em indivíduo positivo para o HIV foi de 12,6 (95%CI: 2.2-54.4), (NEWTON, et al., 1995). Na África do Sul, num estudo de caso-controle, este risco foi de 5.0 (95%CI: 1.7-9.5) (SITAS, et al., 2000). No Brasil, os dados do Ministério da Saúde indicaram um aumento do número de LNH associados a AIDS em indivíduos maiores de 13 anos de idade no momento da notificação da AIDS. No período de 1980 a 1984 foram notificados 6 casos de LNH (cinco casos sistêmicos e um LNH primário de SNC); entre 1985 a 1987 foram notificados 71 casos (60 LNH sistêmicos e 11 LNH primários de SNC), elevando-se, no período de 1998 a junho de 2000, para 2062 casos dos quais 1521 LNH sistêmicos e 541 LNH primários do SNC (DISTRIBUIÇÃO, 1999/2000).

2.3.2 Histopatologia dos LNH em Pacientes HIV-positivos

No início da década de 80, a classificação de LNH supervisionada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados, conhecida como a *Working Formulation*, definiu 3 grupos principais de linfomas. Nesta classificação os linfomas foram divididos de acordo com o comportamento clínico em baixo, alto e grau intermediário de malignidade (NATIONAL, 1982). Em 1996, Bacchi et al. estudaram 20 casos de LNH em AIDS no Brasil, utilizando a classificação *Working Formulation*. Todos os casos foram classificados como LNH de grau intermediário e de alto grau de malignidade. Onze casos foram classificados como difuso de grandes células, quatro como imunoblástico e cinco casos eram de pequenas células não-clivadas tipo Burkitt. A maioria destes casos tinha alto índice mitótico apesar de não terem necrose como achado histológico proeminente (BACCHI, et al., 1996). Anos mais tarde, com a classificação REAL, foram acrescentados à análise histológica tradicional, dados sobre a imunoistoquímica e citogenética do linfoma (HARRIS, et al., 1994). Com esta classificação a lista de subtipos histológicos de LNH foi ampliada e os LNH foram divididos em dois grupos a depender da origem celular: o grupo dos linfomas com origem em linfócitos B e o grupo com origem em linfócitos T e/ou células NK.

Apenas recentemente, no entanto, com a publicação da OMS em 2001 (JAFFE, et al., 2001), é que os linfomas associados à infecção pelo HIV foram classificados separadamente. Nesta classificação, os linfomas associados à infecção pelo HIV foram divididos em três grupos, cada qual com seus subgrupos (**Tabela 1**). No primeiro grupo, encontram-se os tipos histológicos de LNH que também ocorrem em indivíduos imunocompetentes. Neste grupo, os linfomas de células B representam a maioria dos casos nos pacientes HIV-positivos. Os subtipos histológicos de linfoma B listados neste primeiro grupo são: linfoma de Burkitt (LB) clássico, LB com diferenciação plasmocitóide, LB atípico ou tipo-Burkitt e os linfomas

difusos de grandes células B (LDGCB). Estes últimos estão divididos em variante centroblástica (LDGCB-C) e variante imunoblástica (LDGCB-I). Os LNH de ocorrência mais rara nesta população são: o linfoma MALT, linfomas T periféricos e linfomas de células NK.

Tabela 1 - Classificação dos LNH associados ao HIV de acordo com a OMS-2001

1. Linfomas que também ocorrem em pacientes imunocompetentes

Linfoma de Burkitt

Clássico

Com diferenciação plasmocitóide

Atípico

Linfoma Difuso de Grandes Células

Centroblástico

Imunoblástico

Linfoma B extranodal de zona marginal associado à mucosa (linfoma MALT); (raro).

Linfoma T periférico; (raro).

Linfoma de Hodgkin Clássico

2. Linfomas ocorrendo mais especificamente em pacientes HIV+

Linfoma Efusional Primário

Linfoma Plasmoblástico de Cavidade Oral

3. Linfomas que também ocorrem em outros estados de imunodeficiência

Linfoma de Células B Polimórfico (DLPTL)

Fonte: adaptado de JAFFE, et al. (2001).

Os LNH relacionados ao HIV pertencentes ao primeiro grupo da classificação OMS-2001, apesar de exibirem características morfológicas similares àquelas em pacientes HIV-

negativos, têm uma maior quantidade de debris celulares, figuras de mitose, e maior tendência à necrose, sugerindo um maior índice de proliferação e maior índice de crescimento tumoral no grupo de pacientes com AIDS (KNOWLES, 1992). No segundo grupo se encontram os LNH que ocorrem mais especificamente em pacientes HIV positivos. Fazem parte deste grupo o linfoma Efusional Primário (LEP) e o linfoma plasmoblástico da cavidade oral (LPB). O terceiro grupo de LNH em HIV+ é constituído por proliferações linfóides polimórficas conhecidas como doenças linfoproliferativas similares às pós transplante (DLPTL).

2.3.3 Tipos histológicos de LNH em pacientes HIV-positivos

2.3.3.1 LNH que também ocorrem em indivíduos imunocompetentes

O linfoma de Burkitt (**LB**) clássico foi o primeiro subtipo de linfoma B descrito em pacientes com AIDS. Possui um aspecto celular monomórfico com proliferação difusa de células de tamanho médio de citoplasma escasso, núcleo uniforme arredondado contendo de dois a seis nucléolos pequenos. Um padrão descrito como “céu estrelado” é observado graças à presença de macrófagos de citoplasma abundante claro geralmente contendo restos celulares derivados de células neoplásicas. Em geral estes linfomas apresentam um alto índice de proliferação celular com abundantes figuras de mitose, tendência à necrose e alta expressão de antígeno Ki-67, positivo na grande maioria das células tumorais, demonstrado através de técnicas de imunistoquímica com utilização do anticorpo Mib1 direcionado contra este antígeno (CARBONE, 2003). O **LB com diferenciação plasmocitária** é uma variante quase exclusiva dos indivíduos com AIDS representando cerca de 20% dos casos de LNH nestes pacientes. Este linfoma é caracterizado por células de tamanho médio com citoplasma basofílico abundante, núcleo excêntrico e muitos nucléolos proeminentes localizados centralmente (DAVI, 1998). O **LB atípico** também conhecido como tipo-Burkitt é menos freqüente que as

outras variantes, tem características nucleares similares ao LB clássico, porém tem maior pleomorfismo celular e o núcleo pode conter nucléolos mais proeminentes. Esta variante é diagnosticada como tal se possuir a translocação t (8; 14) ou uma de suas variantes ou rearranjo no gene c-MYC.

O **linfoma difuso de grandes células B (LDGCB)** contém numerosos centroblastos misturados com um componente variável de imunoblastos. Quando o número de imunoblastos é maior que 90%, geralmente com características plasmocitóides, classifica-se como **variante imunoblástica (LDGCB-I)** para diferenciar dos demais LDGC ditos **centroblásticos (LDGCB-C)**. As células neoplásicas no LDGCB-C têm tamanho intermediário entre as do LB e LDGCB-I, são arredondadas ou ovaladas, o núcleo é em geral regular e contém um ou mais nucléolos distintos, adjacentes à membrana nuclear. Células neoplásicas grandes com núcleo clivado ou multilobado podem estar presentes em quantidade variável (RAPHAEL, et al., 1991). O LDGCB-I geralmente exibem um padrão tipo “céu estrelado”, no entanto, menos proeminente que no LB; as figuras de mitose são abundantes e estes linfomas têm tendência à necrose. As células neoplásicas são maiores que no LB e no LDGCB-C e têm em geral citoplasma basofílico e núcleo redondo ou oval com nucléolo único proeminente. Podem ser vistas células binucleadas ou multinucleadas e pleomorfismo celular em alguns LDGCB-I (KNOWLES & PIROG, 2001). Tem se observado recentemente que existe uma tendência para aumento na frequência de LDGC e redução no número de casos de LB (LEVINE, 2000).

O **linfoma anaplásico de grandes células (LAGC) de células B** é caracterizado morfológicamente por possuir células grandes pleomórficas com citoplasma abundante e núcleo de formato irregular contendo um ou mais nucléolos proeminentes. Células bizarras e células gigantes multinucleadas lembrando células de Reed-Sternberg estão presentes, além de plasmócitos e macrófagos. A expressão de CD30 é necessária para o diagnóstico, se não

em todas, mas na maioria das células neoplásicas (CARBONE, 2002). De acordo com a classificação REAL o LAGC B é um subtipo dos linfomas difusos de grandes células B, distinto dos linfomas anaplásicos com fenótipo T/0 (HARRIS, et al., 1994). Os linfomas anaplásicos, quando relacionados a AIDS, expressam quase que exclusivamente imunofenótipos de células B ou indeterminado, tratando-se portanto da forma anaplásica do LDGC (TIRELLI, et al., 1995). Exemplos e LAGC com imunofenótipo T têm sido descritos raramente em pessoas infectadas pelo HIV, inclusive com apresentação cutânea (CHADBURN, et al., 1993; DRENO, et al., 1993). Cerca que 15% de LNH sistêmico relacionado a AIDS, na Itália representam LAGC (CARBONE, et al., 1994).

LNH vistos apenas raramente em pacientes com AIDS são: **linfomas T periféricos**, incluindo linfoma de linfócitos grandes granulares, linfoma T de grandes células, síndrome de Sezary, linfoma T angiocêntrico e linfoma *natural killer* (BEYLOT-BARRY, et al., 1999; CANIONI, et al., 2001; GOLD, et al., 1990; RUFF, et al., 1989; BIGGAR, et al., 2001). Raros casos de **linfoma B da zona marginal (tipo MALT)** têm sido descrito tanto em crianças quanto adultos com AIDS (Mc CLAIN, et al., 2000).

2.3.3.2 LNH que ocorrem mais especificamente em pacientes HIV-positivos

O **Linfoma primário de efusões (LEP)** ou linfoma de cavidades corporais apresenta-se tipicamente com derrame pleural ou peritoneal. Pode estar presente também tumor sólido, geralmente afetando o trato gastrointestinal ou tecidos moles. Neste linfoma as células tumorais presentes nas efusões são pleomórficas e bastante heterogêneas em forma e tamanho e apresentam, na maioria das vezes, características plasmocitóides. A marca registrada desta neoplasia é a constante presença do HHV8 nas células neoplásicas (NADOR, et al., 1996). O **Linfoma Plasmoblástico (LPB)** descrito em 1997 (DELECLUSE, et al., 1997), é um tumor

de crescimento rápido, alto índice mitótico, constituído principalmente por células grandes com citoplasma basofílico, núcleo excêntrico, nucléolo único proeminente central ou vários nucléolos localizados na periferia do núcleo. Localiza-se na maioria das vezes na mandíbula e cavidade oral geralmente envolvendo a gengiva e infiltrando ossos adjacentes disseminando para abdômen, retroperitônio, tecidos moles e medula óssea.

2.3.3.3 Doença Linfoproliferativa Tipo Pós-Transplante

O **linfoma polimórfico B**, semelhante ao encontrado no pós-transplante, tem sido descrito em pacientes HIV-positivos, porém em menor freqüência que nos pacientes pós-transplante e representa menos de 5% dos linfomas associados ao HIV (NADOR, et al., 2003).

2.3.4 Imunofenotipagem dos LNH em AIDS

A utilização de anticorpos monoclonais que funcionam em secções de parafina permitiram a incorporação do estudo imunoistoquímico ao diagnóstico anatomo-patológico dos LNH (BOENISH, 1989). A maioria dos linfomas diagnosticados em pacientes HIV-positivos são monoclonais, demonstrando rearranjo clonal de genes de imunoglobulinas nos casos de linfomas B ou dos genes receptores de células T, no caso de linfomas T (KNOWLES, et al., 1988). Existem marcadores comuns a todos os tipos de linfoma, como exemplo o antígeno leucocitário comum (CD45RB ou LCA). Por ser um marcador linfóide universal, este antígeno tem sido usado principalmente no diagnóstico diferencial entre linfomas e neoplasias indiferenciadas. Como a maior proporção dos linfomas em pacientes com AIDS são de origem B, os marcadores mais expressos nas células tumorais são o CD19, CD20, CD79a, CD10 (CARBONE, 2003). Menos freqüentemente, o anticorpo UCHL1 (CD45RO), considerado marcador de células T, também pode ser expresso em células B de linfomas de

alto grau associados a AIDS, principalmente naqueles com diferenciação plasmocitóide. A expressão de HLA-DR ocorre em cerca de metade dos LNH de pacientes HIV+ (HAMILTON-DUTOIT, et al., 1991). Os linfomas plasmoblásticos (LP) podem ser apenas fracamente ou focalmente positivos para o CD45RB e CD79a e mostrar negatividade para o CD20, consistente com a perda destes antígenos nos estágios mais tardios da diferenciação B (HAMILTON-DUTOIT, et al., 1991, DELECLUSE, et al., 1997). Assim como o LP, as células do LEP perdem também a expressão de CD20 e a origem hematolinfóide destes linfomas pode ser confirmada pela expressão de CD45 na maioria dos casos e de imunoglobulina em 20% dos casos. Os LEP podem também expressar fenótipo nulo ou aberrante, como por exemplo, expressão de CD3, um marcador de células T (BEATY, et al., 1999). Imunoglobulina citoplasmática é detectada não só nos LP e LEP como também em linfoma de Burkitt com diferenciação plasmocitóide e linfoma imunoblástico com diferenciação plasmoblástica. Antígenos associados a ativação celular como o antígeno de membrana epitelial (EMA), CD30, CD38, CD71, podem estar presentes em alguns linfomas, principalmente no LDGC-I e no LEP (CARBONE, 2003). Nos raros linfomas de células T observados nestes pacientes, ocorre em geral, expressão de CD2, CD3, CD4 ou CD8, CD16 ou CD56. Nos 20 casos de LNH em AIDS descritos em 1996 no Brasil, 18 casos tinham imunofenótipo B, um caso imunofenótipo T e um caso fenótipo nulo (BACCHI, et al., 1996).

2. 3.5 Apresentação Clínica dos LNH em AIDS

O linfoma tem sido considerado tradicionalmente como uma manifestação tardia da infecção pelo HIV. Este tem maior probabilidade de ocorrer no contexto de imunossupressão severa, com contagens de CD4 abaixo de 200/mm³ e em pacientes com história prévia de patologias associadas a AIDS (LEVINE, et al., 2001). O LNH, no entanto, pode ser a primeira manifestação de AIDS (LEVINE, 1993). De acordo com os critérios estabelecidos pela

classificação do CDC-1993 apenas os linfomas de Burkitt, o linfoma difuso de grandes células, incluindo a variante imunoblástica e o linfoma cerebral primário, são considerados como condições clínicas que definem o diagnóstico da AIDS nos pacientes HIV positivos (CDC,1992). De forma similar ao que ocorre em pacientes HIV negativos, os linfomas são mais frequentes em homens que em mulheres com AIDS. O linfoma é o câncer mais comum em crianças infectadas pelo HIV (LEVINE, et al., 2001). A maioria dos pacientes apresenta-se em estágios clínicos mais avançados, com doença volumosa e sintomas sistêmicos de perda de peso, febre e/ou sudorese noturna (sintomas B). O envolvimento primário de sítio extra-nodal é comum, em torno de 60-90% dos casos. Qualquer sítio pode estar envolvido, porém os mais frequentes são o trato gastrointestinal, medula óssea, fígado e sistema nervoso central (LEVINE, 2000). Os casos descritos por Bachhi et al., no Brasil em 1996, ocorreram também numa proporção maior de homens que de mulheres, porém em apenas 33% dos casos foi observado envolvimento extra-nodal.

A desidrogenase láctica sérica (LDH) encontra-se, em geral elevada, de forma semelhante ao encontrado em LNH agressivos na população geral. Existe uma associação significativa entre o subtipo de linfoma e o estado da infecção pelo HIV. O LDGC tende a ser diagnosticado nos pacientes com contagens mais baixas de CD4, geralmente inferiores a $100 \times 10^6/L$ e o LB em pacientes com CD4 mais elevados, geralmente mais de $200 \times 10^6/L$ (CARBONE, 1997). STRAUS, et al. (1998), identificaram quatro características associadas a prognóstico desfavorável nos pacientes com LNH e AIDS: idade maior que 35 anos, CD4 menor que 100/dL, estágio clínico III/IV, e história de uso de drogas endovenosas. O índice de prognóstico internacional desenvolvido inicialmente para LNH de comportamento clínico agressivo em pacientes HIV negativos, também tem sido validado para pacientes HIV + (ROSSI, et al., 1999).

O linfoma primário do sistema nervoso central é considerado como uma condição clínica que define o diagnóstico da AIDS (CDC, 1992). A vasta maioria destes linfomas são do tipo difuso de grandes células. Os pacientes podem ter apresentação clínica bastante variável mas, em geral são encontradas massas cerebrais volumosas, multifocais ou únicas. Qualquer região do cérebro pode estar envolvida, porém cerca de 75% dos tumores são localizados adjacentes as superfícies ventriculares ou convexidades corticais. Os sintomas incluem deficiências neurológicas como paresias ou paralisias de nervos cranianos; convulsões podem ocorrer em 25% dos pacientes e cefaléia é comum. Alteração mental de personalidade ou comportamento, confusão, letargia, perda de memória podem ser vistas. O líquido contém células malignas em 25% dos casos. Na maioria dos casos, os pacientes têm imunodeficiência severa, baixas contagens de CD4 e doença de longa duração (FINE & MAYER, 1993). No nosso meio, Santos (2001), demonstrou a ocorrência de 4,8% de linfomas primários do SNC, numa série de 62 casos consecutivos de AIDS necropsiados no período de 1991 a 1999. Os pacientes desta série, tinham como manifestações neurológicas: alteração mental, déficit motor e distúrbio de sensibilidade e em um deles foram observados cefaléia e sinais de hipertensão intracraniana.

2.3.6 Patogênese dos LNH em pacientes com AIDS

A patogênese do LNH relacionado a AIDS envolve múltiplos fatores, incluindo fatores do hospedeiro e fatores intrínsecos do clone tumoral. Os fatores do hospedeiro são comuns em todos os tipos histológicos enquanto que, as anormalidades acumuladas no clone tumoral são, em geral, específicas para cada tipo particular de linfoma (GAIDANO, et al., 2000). Dentre os fatores do hospedeiro destaca-se o grau de imunossupressão induzido pelo HIV, a redução na imunovigilância, a desregulação na produção e liberação de citocinas e fatores de crescimento, o estímulo à diferenciação e proliferação crônica de células linfóides. Em

relação ao clone tumoral, o LNH em AIDS é caracterizado por acúmulo rápido e sucessivo de lesões genéticas distintas envolvendo proto-oncogenes e genes supressores de tumor (KNOWLES & PIROG, 2001), (**Tabela 2**). Células que se originam em diferentes estágios de maturação, dão origem a diferentes tipos e tumor. Diferentes eventos transformadores a nível molecular, também se associam a tipos distintos de LNH nestes pacientes. O nível de imunodeficiência do hospedeiro, por sua vez, varia com os diferentes tipos de LNH em indivíduos com AIDS. (CARBONE, 2002).

2.3.6.1 O Papel da Imunossupressão

A imunossupressão e a redução da imunovigilância de células T induzida pelo HIV certamente são os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento de LNH nestes pacientes (BERAL, et al., 1991). O aumento da incidência de LNH em pacientes com imunodeficiências congênitas e adquiridas não relacionadas a AIDS, reforçam o importante papel deste fator na gênese dos linfomas em pacientes HIV-positivos (HOOVER, 1992). O risco de LNH nestes pacientes aumenta bastante quando a contagem de CD4 é menor que $50/\text{mm}^3$ e é proporcional ao tempo de imunossupressão (LEVINE, et al., 1991). Uma redução na resposta T citotóxica específica para EBV e um aumento da carga deste vírus, estão relacionados a um aumento na probabilidade destes pacientes desenvolverem linfoma (BIRX, et al., 1986).

2.3.6.2 O Papel da Estimulação Crônica de Linfócitos B

O alto nível de estimulação de células B que ocorre em associação com o HIV pode levar a proliferação de determinados clones de linfócitos B que podem acumular lesões genéticas e transformar-se em células neoplásicas (PRZYBYLSKI, et al., 1996). Em geral o LNH em pessoas infectadas pelo HIV é precedido por linfadenopatia generalizada persistente, sugerindo uma relação patogênica entre a hiperplasia de células B, sobretudo com presença de expansão oligoclonal de linfócitos B que ocorre nesta condição, com o desenvolvimento subsequente de linfoma (PELICCI, et al., 1986).

2.3.6.3 O Papel dos Proto-Oncogenes

Ressalta-se na patogênese dos LNH tanto nos pacientes HIV+ quanto naqueles HIV-, a importância dos proto-oncogenes. Os proto-oncogenes são genes celulares normais envolvidos no controle da proliferação e diferenciação celular e que têm potencial para contribuir para a indução ou progressão de tumores quando sua estrutura ou função está alterada (KLEIN & KLEIN, 1985). Em linfomas, as translocações de proto-oncogenes ou mutações tem sido descritas como marcadores moleculares possivelmente implicados na gênese dos diferentes subtipos. A translocação cromossômica recíproca entre a banda 8q24, região do proto-oncogene **c-MYC** e um dos loci do gene de Imunoglobulina (Ig), (Ig_H na posição 14q32 ou Ig_K no 2p11 ou Ig_λ na posição 22q11), é comum em todas as variantes de LB incluindo virtualmente todos os LB em AIDS (GAIDANO, 1998). O **c-MYC** é um fator de transcrição expresso em células em proliferação e envolvido no controle da fase G0/G1 do ciclo celular. Este fator é regulado para menos durante a diferenciação celular e é envolvido na modulação da apoptose (GAIDANO & DALLA-FAVERA, 1992). A translocação do 8q24 leva a desregulação na função e a mutação na sequência de aminoácidos do proto-oncogene **c-**

MYC que passa a escapar de mecanismos de controle e a atuar como um transativador constitutivo com capacidade de transformar células B *in vitro* (LOMBARDI, et al., 1987). As translocações na banda 8q24 envolvendo o c-MYC também podem ser detectadas em cerca de 20% dos linfomas difusos de grandes células (BALLERINI, et al., 1993). Alterações moleculares no proto-oncogene **BCL-6** ocorre em cerca de 70% dos LNH relacionados a AIDS e representa a alteração genética mais comum nestes linfomas (**Tabela 2**). A proteína BCL-6 é um fator de transcrição contendo domínios tipo dedos de zinco, atuando como um repressor da transcrição. Em linfoma, este proto-oncogene pode ser afetado por rearranjos cromossômicos ou por mutação (CARBONE, 1997). O rearranjo deste proto-oncogene localizado na banda 3q27 ocorre principalmente na translocação t(3;14) (q27;q23) vista apenas nos LDGC. Podem ocorrer também mutações na seqüência 5' regulatória deste proto-oncogene tanto no LDGC quanto no LB (GAIDANO, et al., 1997). Outro oncogene da família Bcl envolvido em translocações em linfomas é o **BCL-2**. Em pacientes imunocompetentes com linfomas foliculares e que exibem a translocação (14:18) este gene fica sob influência do gene promotor da imunoglobulina no cromossomo 14, sendo expresso constitutivamente em níveis elevados. A proteína BCL-2 é uma proteína da membrana mitocondrial interna que previne a morte celular programada, ou seja, apoptose. O seu papel na gênese de linfomas está relacionado ao aumento da sobrevivência celular, permitindo o acúmulo de mutações genéticas e possível transformação maligna. Os linfomas primários do SNC em pacientes com AIDS freqüentemente expressam altos níveis de proteína BCL-2, na ausência de rearranjos (GAIDANO, et al., 1998). Mutações na família de proto-oncogenes **Ras**, apesar de ocorrerem em apenas 15% dos casos de linfomas relacionados a AIDS, não têm sido verificadas em pacientes imunocompetentes; este fato que distingue os pacientes com e sem AIDS, sugere mecanismos patogênicos distintos associados a linfomogênese nos pacientes com AIDS (BALLERINI, et al., 1993). O Estudo de alguns linfomas T em pacientes com AIDS mostrou que o genoma do HIV se integra num sítio adjacente ao proto-oncogene **c-fes**. O *fes* (*feline*

sarcoma vírus) codifica uma tirosina kinase que é estimulada por citocinas, incluindo a interleucina 3 e o GM-CSF levando a ativação de macrófagos. (BOWER, 2001).

Tabela 2: Anormalidades citogenéticas e associação viral nos LNH em AIDS

	EBV(%)	HHV8 (%)	Anormalidades genéticas		
			c-MYC	BCL-6	p53
Sistêmicos					
LB	30-50	-	100	-	50-60%
LDCGB-C	30	-	-	20	Raro
LDGCB-I	90	-	-	-	Raro
LEP	90-100	100	-	-	-
LPB	50	-	-	-	-
Primário do SNC	100	-	-	-	-

Fonte: adaptado de Carboni (2003). LB-linfoma de Burkitt, LDGCB-Linfoma difuso de grandes células B, LEP-Linfoma primário de efusões, LPB-Linfoma plasmoblástico.

2.3.6.4 O Papel dos Genes Supressores de Tumor

O gen supressor de tumor p53 desempenha um importante papel no desenvolvimento e progressão de neoplasia em humanos exercendo um papel regulatório negativo no controle do ciclo celular e na regulação da replicação celular. Mutações que inativam ou causam deleções no gene p53 são descritas em 50-60% dos LB e 40% dos LDGC associados a AIDS (MARTIN, et al., 1998). (Tabela 2)

2.3.6.5 O Papel da Desregulação de Citocinas

As citocinas são uma família de moléculas envolvidas na regulação do sistema imune e da hematopoese, inclusive na proliferação e diferenciação de linfócitos B. O HIV pode induzir células reativas no tumor a liberar citocinas linfotrópicas para células B que atuam de forma parácrina no tumor. Algumas citocinas podem ser produzidas pelo próprio clone tumoral, atuando de forma autócrina (GAIDANO, et al., 2000).

Em situações como a AIDS, onde ocorre tanto ativação quanto supressão do sistema imune, a desregulação de citocinas ou receptores de citocinas podem estar relacionados ao risco aumentado de desenvolver LNH. Os LNH em AIDS podem, a depender das características biológicas do tumor, estar associados à produção de IL-10, IL-6, TNF α (PASTORE, et al., 1998). Em pacientes HIV-positivos com heterozigose para a variante do CCR5 deletado de 32bp ocorre redução de cerca de 3 vezes no risco de LNH (RABKIN, et al., 1999).

2.3.6.6 O Papel dos Vírus

2.3.6.6.1 HIV

O próprio HIV por si só pode atuar como um agente mutagênico promovendo o desenvolvimento de neoplasia (HERNDIER, et al., 1992). Entretanto, apenas raramente este vírus está diretamente envolvido na patogênese do linfoma associado a AIDS e em geral, este vírus não parece ser um responsável direto pela transformação maligna de células linfóides em pacientes soropositivos. As células tumorais dos LNH que ocorrem na AIDS não possuem seqüências do genoma DNA do vírus HIV, exceto em raros casos de linfoma T nos quais, pode ser identificado integração viral em células T neoplásicas (KNOWLES, 1992;

HERNDIER, et al., 1992). A infecção das células endoteliais pelo HIV potencializa a adesão de células do linfoma ao endotélio, fazendo com que a população neoplásica fique nas proximidades de fatores de crescimento ligados à membrana, facilitando o extravasamento das células de linfoma em tecidos (MOSES, et al., 1997). O HIV tem um papel indireto na linfomogênese, já que é responsável pela imunodeficiência a qual, por sua vez, é o cenário onde o linfoma se desenvolve.

2.3.6.6.2 Herpesvírus Humano Tipo 8 (HHV8)

O herpes vírus humano 8 (HHV8) é um gammaherpes vírus, identificado originalmente em lesões do sarcoma de Kaposi. No genoma de 140kb deste vírus, além de proteínas estruturais e enzimas virais, são codificadas 11 proteínas eucarióticas que podem contribuir para a formação de tumor. Dentre estas proteínas destacamos homólogos para ciclina D (ORF 72), interleucina 6 (ORF K2), bcl-2 (ORF 16), fator regulador do interferon (ORF K9) e quimiocinas CC (ORF K4 e ORFK6). Vários destes genes demonstraram possuir propriedades de transformação em células transfectadas e/ou culturas celulares (BOWER, 2001; CESARMAN & KNOWLES, 1999). O HHV8 tem sido detectado no LEP e em doença de Castleman multicêntrica em pacientes soropositivos para HIV. As células tumorais do LEP possuem número elevado de cópias do vírus HHV8. A associação entre o HHV8 e o linfoma efusional primário foi útil na caracterização deste tipo de linfoma como um subtipo distinto dos demais já que, este vírus não é visto em outros tipos de linfoma associados a AIDS (NADOR, et al. 1996; CESARMAN, et al., 1995), (Tabela 2).

2.3.6.6.3 Vírus Linfotrópico de Células T Humano (HTLV)

Têm sido descritos raros pacientes com co-infecção por HIV e HTLV-I com diagnóstico de leucemia/ linfoma de células T do adulto (ATL) ou em linfomas cutâneos (SHIBATA, et al., 1989; GUITART, 2000). A maioria dos estudos, no entanto, não demonstram a presença de HTLV-I em células neoplásicas de pacientes HIV positivos, mesmo naqueles com linfoma T.

2.3.6.6.4 Vírus da Hepatite C (HCV)

A infecção pelo HCV é altamente prevalente em pacientes HIV positivos, sobretudo nos usuários de drogas endovenosas e hemofílicos (ENGELS, et al., 2002). Em pessoas não infectadas pelo HIV, a infecção pelo HCV é associada a um risco de 13 vezes maior de linfoma não-Hodgkin (ZUCKERMAN, et al., 1997). Nos pacientes infectados com HIV, no entanto, tal correlação não tem sido identificada (ENGELS, et al., 2002; TIRELLI, et al., 1997).

2.3.6.6.5 Vírus de Epstein – Barr (EBV)

O EBV foi isolado pela primeira vez na década de 60 em crianças africanas com linfoma de Burkitt. Este vírus, hoje classificado como um carcinógeno do grupo 1, está associado a uma variedade de neoplasias. Além de ser encontrado em células tumorais do linfoma de Burkitt, o EBV também pode ser encontrado no carcinoma de nasofaringe, no linfoma de Hodgkin, nas desordens linfoproliferativas pós-transplante (DLPTL), no linfoma não Hodgkin de células T, no carcinoma gástrico e possivelmente associado ao câncer de mama, carcinoma hepatocelular e tumores de músculo liso em pacientes imunodeprimidos (NIEDOBITEK, et al., 2001).

O EBV tem sido detectado em cerca de 40-67% pacientes com AIDS e LNH sistêmico (AMBINDER, 2001). Nestes pacientes, a positividade para EBV varia de acordo com o tipo histológico (**Tabela 2**). Conforme JAFFE, et al. (2001), o percentual de casos positivos para EBV é de aproximadamente 30% no LB clássico, 40-50% em LB com diferenciação plasmocitóide e 30-50% nos LB atípicos. A frequência da infecção pelo EBV nos LDGC é de cerca de 30% nos centrolásticos e de 90% nos imunoblásticos. Os LPB demonstram esta infecção em 50% dos casos. O EBV está presente na maioria dos casos de DLPTL (JAFFE, et al., 2001). O LEP apresenta-se frequentemente com infecção dupla por HHV8 e EBV (NADOR, et al., 1996). A maior frequência da infecção pelo EBV têm sido vista em pacientes HIV-positivos com LNH primário de sistema nervoso central, nos quais o índice de positividade para EBV é maior que 80%, chegando em grande parte das séries a 100% (CAMILLERI-BROËT, et al., 1997). O EBV é consistentemente encontrado líquido dos pacientes com linfoma primário de sistema nervoso central em pacientes com AIDS e pode preceder em até 17 meses o aparecimento de LNH (AL SHAHI, et al., 2000).

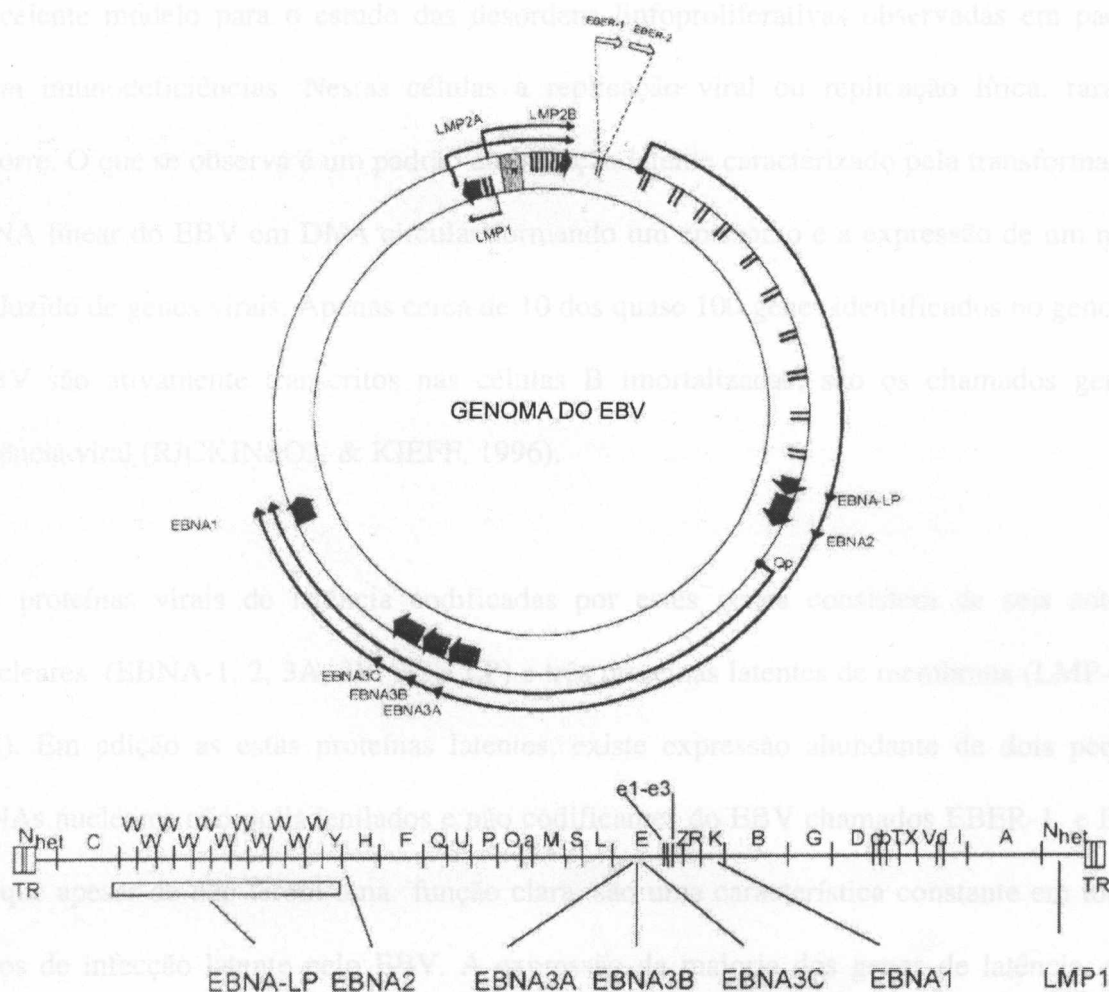
O papel do EBV no desenvolvimento de linfomas ainda é objeto de estudo, porém algumas evidências apontam para um papel do EBV no desenvolvimento de LNH em AIDS tais como: 1) a redução na resposta imune ao EBV em pacientes HIV-positivos, 2) a demonstração de translocações cromossômicas nos LNH relacionados a AIDS semelhantes às do Burkitt endêmico, 3) a identificação de antígenos virais do EBV nas células tumorais, 4) a presença de EBV em linfadenopatias e a correlação destas com o risco de desenvolvimento de linfomas, 5) a demonstração de monoclonalidade do EBV em LNH sugerindo que a infecção precedeu a proliferação clonal neoplásica (KAYE, et al., 1993; HAMILTON-DUTOIT, et al., 1991).

No Brasil, Bachi et al demonstraram infecção pelo EBV em 55% dos 20 casos de LNH em pacientes com AIDS estudados e a positividade variou de acordo com a histologia: 3 de 4 casos (75%) nos linfomas de grandes células variante imunoblástica; 6 de 11 casos (55%) nos demais linfomas difusos de grandes células e 2 de 5 casos (40%) nos de linfoma tipo Burkitt.

2.4 ESTRUTURA E PADRÃO DA INFECÇÃO DO EBV EM HUMANOS

O EBV é um membro do gênero linfocriptovírus da família dos γ Herpesvírus que provavelmente evoluiu a partir de vírus de primatas não humanos. O genoma viral é encontrado no nucleocapsídeo, circundado pelo envelope viral. O genoma do EBV consiste de uma molécula de 172kbp de DNA linear de dupla hélice, a qual codifica aproximadamente 100 proteínas virais (**Figura 2**). Estas proteínas são importantes para regulação da expressão de genes virais, replicação do DNA viral, formação de componentes estruturais do vírion e modulação da resposta imune do hospedeiro. A infecção em humanos geralmente ocorre por contato com secreções orais. O vírus replica em células de orofaringe infectando principalmente células epiteliais e linfócitos B.

Figura 2 – Representação esquemática do genoma do EBV



Fonte: adaptado de YOUNG & MURRAY (2003)

A infecção de células epiteliais pelo EBV *in vitro* resulta em replicação ativa com produção de vírus e lise celular. Em contraste, a infecção *in vivo* de células B resulta em infecção latente e imortalização destas células (COHEN, J.I., 2000). O EBV infecta quase todos os seres humanos e persiste por toda a vida do indivíduo graças a sua habilidade de se replicar e infectar outros indivíduos pela saliva e a sua capacidade de escapar da ação do sistema imune determinando infecção latente em linfócitos B.

Linfócitos B normais em repouso infectados pelo EBV apresentam crescimento espontâneo contínuo em cultura e dão origem a uma linhagem de células B imortalizadas que são

conhecidas como linhagens de células linfoblastóides (LCL). As LCL representam um excelente modelo para o estudo das desordens linfoproliferativas observadas em pacientes com imunodeficiências. Nestas células a replicação viral ou replicação lítica, raramente ocorre. O que se observa é um padrão de infecção latente caracterizado pela transformação do DNA linear do EBV em DNA circular formando um episossomo e a expressão de um número reduzido de genes virais. Apenas cerca de 10 dos quase 100 genes identificados no genoma do EBV são ativamente transcritos nas células B imortalizadas; são os chamados genes de latência viral (RICKINSON & KIEFF, 1996).

As proteínas virais de latência codificadas por estes genes consistem de seis antígenos nucleares (EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C e LP) e três proteínas latentes de membrana (LMP-1, 2A, 2B). Em adição as estas proteínas latentes, existe expressão abundante de dois pequenos RNAs nucleares não poliadenilados e não codificantes do EBV chamados EBER-1 e EBER-2, que apesar de não terem uma função clara, são uma característica constante em todos os tipos de infecção latente pelo EBV. A expressão da maioria dos genes de latência, se não todos eles, é necessária para que ocorra a imortalização eficiente de linfócitos B, pois nenhum destes produtos gênicos isolados é capaz de imortalizar os linfócitos B por si mesmo (DELECLUSE & HAMMERSSCHMIDT, 2000). Apesar da maioria das LCL apresentarem apenas genes de latência, uma pequena proporção de células apresentam expressão de BZLF-1 e BRLF-1 que são proteínas virais transativadoras, mediadoras de uma série de eventos incluindo a expressão de genes relacionados com a replicação do EBV (BCRF-1 e BHF-1), que culminam com a morte da célula infectada e liberação de vírions infecciosos (YOUNG & MURRAY, 2003). As LCL expressam todos os genes de latência, correspondendo ao denominado padrão de latência tipo III. Em outras células infectadas pelo EBV, o padrão de expressão gênica pode ser mais restrito, caracterizando a latência tipo II como no linfoma de Hodgkin, ou latência tipo I nos casos de linfoma de Burkitt (NIEDOBITEK, et al., 2001).

Três padrões de expressão gênica nas infecções latentes pelo EBV são vistos (**Tabela 3**):

Latência tipo I : neste padrão, ocorre a expressão de um espectro muito limitado de produtos gênicos virais. Em geral se limitando apenas a transcritos de EBER, associados às proteínas EBNA-1. Tal padrão é encontrado em linfócitos circulantes de portadores sadios e também é característico de LB e carcinoma gástrico.

Latência tipo II : caracterizado pela co-expressão adicional de LMP-1 e LMP-2B. É visto em doença de Hodgkin, linfoma de células T e carcinoma de nasofaringe ocorrendo predominantemente em hospedeiros imunocompetentes.

Latência tipo III : se refere à expressão de todo o espectro de genes de latência viral , todos os EBNA (1, 2, 3A, 3B, 3C , LP), as LMP (1, 2A, 2B) e EBER. Encontrado transitoriamente na mononucleose e processos linfoproliferativos que se desenvolvem em hospedeiros imunodeprimidos.

Tabela 3 - Tipos de Latência do EBV

Latência	EBERs	EBNAs				LMP	
		1	2	3A,B,C	LP	1	2A/B
Tipo I	+	+	-	-	-	-	-
Tipo II	+	+	-	-	-	+	+
Tipo III	+	+	+	+	+	+	+

LMP-proteína latente de membrana do EBV, EBNA-Antígenos nucleares do EBV

FONTE: adaptada de NIEDOBITEK& YOUNG
In: The Non-Hodgkin's Lymphomas, Ian Magrath,
2. ed, 199, Arnold, pp: 309 - 329

Apesar dos padrões de expressão gênica serem úteis para caracterizar várias entidades histopatológicas, na prática há heterogeneidade de expressão dentre os diferentes tumores de um mesmo tipo histológico e mesmo dentre as células de um dado tumor (GULLEY, 2001).

2.4.1 Os Genes de Latência do EBV na Resposta Imune e no Processo de Imortalização de Linfócitos

O EBNA-1 é uma fosfoproteína nuclear que tem função de ligadora de DNA e por este motivo é requerida para replicação e manutenção do genoma do EBV (YOUNG & MURRAY, 2003). O EBNA-1 é uma proteína viral consistentemente expressa em todas as formas de latência viral do EBV, ela se liga a vários domínios no DNA viral e permite que o genoma do EBV seja mantido como um episomo de DNA circular sendo crucial para persistência do DNA viral dentro da célula infectada (NIEDOBITEK, et al., 2001). Esta proteína viral gera sinais inibitórios que interferem com o processamento e apresentação antigênica contribuindo para resistência da célula infectada pelo EBV a ação de células T citotóxicas (LEVITSKAYA, et al., 1995). Apesar de WILSON & LEVINE (1996), demonstrarem que camundongos transgênicos expressando EBNA-1 desenvolviam linfoma B, sugerindo um possível papel na oncogênese, a contribuição desta proteína na imortalização de células humanas ainda não é clara.

A EBNA-2 é uma fosfoproteína viral, essencial no processo de imortalização de linfócitos B. Vírus recombinantes, obtidos experimentalmente com mutação por deleção ou inserção de seqüências de nucleotídeos, indicam que pelo menos quatro domínios separados de EBNA-2, são essenciais para o processo de transformação de linfócitos B (COHEN, J.I., et al., 1991). Tanto o EBNA-2 quanto o LMP-1 são alvos potenciais para as células T citotóxicas (COHEN, J.I., 2000). O EBNA-2 tem propriedade de induzir expressão celular de antígenos de ativação como, por exemplo, o CD21, CD23, C-FGR, C-MYC e de LMP-1 do EBV (ABBOT, et. al.,

1990). As diferenças de sequência no gene EBNA-2 permitem a classificação do EBV em tipo 1 (EBV-1) e tipo 2 (EBV-2) sendo que o EBV-1 tem demonstrado um maior potencial de transformação *in vitro* (FASSONE, et al., 2002).

EBNA-3A, 3B, 3C constituem uma família de genes relacionados entre si e que agem como reguladores transcricionais com propriedades de repressão e ativação (NIEDOBITEK, et al., 2001). São os maiores determinantes do reconhecimento imune da célula infectada por linfócitos T citotóxicos (MURRAY, et al., 1992). O EBNA-3C é imprescindível no processo de immortalização *in vitro*. O EBNA-3A parece ser importante para iniciação do processo de immortalização *in vitro*, enquanto que o EBNA-3B parece ser dispensável (TOMKINSON, et al., 1993).

EBNA-LP é visto atualmente como um co-ativador, reforçando as propriedades transativadoras do EBNA-2, não sendo requerido no processo de transformação de células B *in vitro* (NITSCHKE, et al., 1997).

LMP-1 é uma proteína integral de membrana contendo seis segmentos transmembrana que formam agregados multiméricos na membrana plasmática (NIEDOBITEK, et al., 2001). A LMP-1 e o EBNA-2 desempenham um papel central na iniciação e manutenção da transformação e proliferação de linfócitos B infectados. KENNETH et al., (1993), demonstraram que EBV recombinantes com mutações obtidas pela inserção de sequências *nonsense* em determinadas porções do LMP-1 foram incapazes de transformar linfócitos B. O LMP-1 é essencial para transformação de linfócitos B induzida pelo EBV *in vitro*. O LMP-1 atua como oncogêneo e sua expressão em camundongos transgênicos induz o aparecimento de linfoma B (KULWICHIT, et al., 1998). O LMP-1 induz a expressão de Bcl-2 em linfócitos B infectados, protegendo-os da apoptose (HENDERSON, et al., 1991). O LMP-1 mostra

bastante homologia com o receptor celular CD40 e juntamente com este é capaz de resultar na ativação de NFκB (ELIOPOULOS, et al., 1997). A interação de alguns domínios do LMP-1 com membros da família de fatores associados ao receptor de TNF (TRAF) leva adicionalmente a elevação dos níveis de NFκB (IZUMI & KIEFF, 1997). O LMP-1 se comporta, portanto, como um receptor constantemente ativado da superfamília do receptor do TNF. Além disto, alguns estudos têm demonstrado a capacidade do LMP-1 de interagir com proteínas Janus kinase 3 (JAK 3) e STAT 3, levando a um aumento na fosforilação de resíduos de tirosina das mesmas (GIRES, et al., 1999). A via JAK/STAT, por sua vez, é reconhecida como importante em vários mecanismos celulares, como proliferação e proteção da apoptose de células linfóides (LEONARD & O'SHEA, 1998). O LMP-1 parece ter habilidade de suprimir a expressão de Bcl-6. Em estudos com LNH em AIDS, observou-se que a expressão de BCL-6 e LMP-1 foram mutuamente exclusivas em linfomas positivos para EBER (CARBONE, et al., 1997).

LMP-2A e LMP-2B são proteínas codificadas pelo mesmo gene viral (LMP-2). São proteínas integrais de membrana que interferem com os mecanismos de sinalização intracelular, sobretudo na transdução de sinal de imunoglobulina (FRUEHLING, et al., 1996). O LMP-2 tem um papel em modificar o programa normal de desenvolvimento dos linfócitos B favorecendo a manutenção da latência do EBV. Estudos recentes mostram que o LMP-2A pode transformar células epiteliais (YOUNG & MURRAY, 2003).

2.4.2 Os Genes de Latência do EBV nos LNH de pacientes com AIDS

Os LNH em pacientes com AIDS positivos para o EBV podem apresentar-se com qualquer um dos três tipos principais de latência viral, no entanto, os casos expressando latência tipo I e tipo III, são mais encontrados que aqueles expressando latência tipo II. A proporção de células tumorais expressando antígenos de latência viral, particularmente o EBNA-2, pode

variar em diferentes áreas do tumor (HAMILTON-DUTOIT, et al., 1993). A expressão antígenos de latência do EBV, na maioria dos casos de LNH em pacientes HIV+ e em outras formas de linfoma associados a outros estados de imunodeficiência é limitada a uma minoria de células tumorais (YOUNG, et al., 1989).

Segundo CARBONE, et al. (1993), os linfomas em pacientes com AIDS podem ser divididos em dois grupos baseados na expressão da latência viral do EBV, sobretudo na expressão de LMP-1. No primeiro grupo estão os LNH que em geral são negativos para o LMP-1 e no segundo grupo aqueles nos quais a positividade para LMP-1 é mais freqüente (**Tabela 4**).

Tabela 4

Linfomas em AIDS: Diferentes Categorias Patológicas Baseadas na Expressão de LMP1

LMP-1 Negativos:

Centroblástico (*Working Formulation* (WF) grupo G)

Pequenas células não clivadas (WF grupo J) com ou sem diferenciação plasmoblástica

Plasmoblástico

Células blásticas com características intermediárias

Alguns imunoblásticos (WF grupo H)

LMP-1 Positivos:

Anaplásico de grandes células CD30+

Linfomas de Hodgkin (celularidade mista e depleção linfocitária)

Alguns imunoblásticos (WF grupo H)

FONTE :Adaptado de CARBONE, et al., 1993.

HAMILTON-DUTOIT, et al. (1993), sugeriram, baseados em estudos de expressão de genes de latência viral do EBV, a possibilidade de modelos distintos na patogênese destes linfomas associado a AIDS. No primeiro modelo, dois grupos de LNH foram identificados. O primeiro grupo é análogo as linfoproliferações que ocorrem em associação com outras imunodeficiências, neste estão incluídos alguns LDGC e o linfoma primário de SNC. Estes apresentam padrão de latência tipo III, ocorrem, em geral, em indivíduos bastante imunossuprimidos, têm envolvimento preferencial de sítios extranodais e maior expressão de moléculas de adesão e de antígenos de ativação celular. Nestes, a frequência de positividade para EBV é alta, praticamente em 100% dos LNH primários de SNC e em até 80% dos LDGC-I. A expressão de LMP-1 e EBNA-2 é importante na iniciação e manutenção da proliferação tumoral neste grupo de LNH. Ainda dentro do primeiro modelo proposto, porém, num segundo grupo, estariam aqueles casos de LDGC com expressão de padrões de latência mais restritos, tipo I ou tipo II. Nestes, há uma tendência de acometimento principalmente de sítios nodais e a expressão de baixos níveis de moléculas de adesão e antígenos de ativação celular que contribuem para que as células tumorais nestes linfomas escapem da imunovigilância. O papel do EBV nestes linfomas é menos linear, podendo representar apenas um dos vários fatores necessários na patogênese. No segundo modelo estariam o LB e suas variantes. Nestes tumores o LMP-1 esta presente em apenas um terço dos casos, à semelhança dos LB endêmicos.

2.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO EBV

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo EBV é feito pela demonstração do vírus, antígenos virais, DNA viral ou pela resposta sorológica. O vírus biologicamente ativo pode ser isolado da saliva, sangue periférico ou tecido linfóide tomando-se como base, sua capacidade de imortalizar linfócitos humanos em cultura (RICKINSON & KIEFF 1996). Este

ensaio, no entanto, consome muito tempo e requer técnicas de culturas de tecidos, nem sempre disponíveis. A sorologia tradicional é a melhor forma de avaliar infecção aguda versus remota em indivíduos saudáveis. O teste de carga de DNA viral por amplificação quantitativa de DNA em amostras de sangue é um teste laboratorial promissor, útil no monitoramento e diagnóstico precoce de DLTPT (GULLEY, 2001). O método mais específico para demonstrar EBV em tecido é a hibridização usando sonda de RNA marcada. Duas técnicas, em geral, são utilizadas, a hibridização por *Southern blot*, a qual é capaz de distinguir porções específicas do DNA do EBV presente em lesões, e a hibridização *in situ*. A hibridização *in situ* é mais sensível que o *Southern blot* (HAMILTON-DUTOIT, et al., 1989). A hibridização *in situ* para EBER pode ser feita em secções de parafina ou em preparados citológicos. Os protocolos de hibridização podem usar sondas de oligonucleotídeos de DNA, sondas de RNA ou de DNA. A interpretação de resultados é feita pela visualização ao microscópio ótico do sinal nuclear do EBER nas células com infecção latente. A principal vantagem desta técnica é a possibilidade de identificar a célula infectada no contexto das características histológicas e citológicas do tecido analisado. Falso negativos podem ocorrer em virtude da degradação de RNA, indicando a necessidade de controles. Em tecido, a detecção de transcritos de RNA do EBV (EBER) por hibridização *in situ*, é considerada o padrão ouro para identificar a infecção por este vírus em lesões histopatológicas (GULLEY, 2001). A imunoistoquímica para LMP-1 do EBV, é usada de rotina para detectar infecção latente pelo EBV. Apesar deste método ser tão efetivo quanto a hibridização *in situ* para detecção de EBV em casos de linfoma de Hodgkin, mononucleose infecciosa e nas desordens linfoproliferativas pós-transplante; nos LNH e carcinomas o LMP-1 é geralmente indetectável, mesmo nos casos positivos para EBER por hibridização. A imunoistoquímica para LMP-1 pode ser feita em secções de parafina, com a utilização de anticorpos comercialmente disponíveis. O sinal da LMP-1 é granular e localizado no citoplasma e na superfície da membrana (GULLEY, 2001). A restrição da expressão da maioria das proteínas virais, inclusive LMP-1, às neoplasias

associadas apenas ao padrão de latência tipo II e III o torna esta técnica menos sensível como marcador da infecção.

2.6 AIDS NA ERA DA TERAPIA ANTI-RETROVIRAL DE ALTA EFICÁCIA

A combinação de três ou mais drogas antiretrovirais incluindo inibidores da protease e inibidores da transcriptase reversa, na denominada HAART, tem demonstrado sucesso em reduzir a replicação viral e aumentar a contagem de linfócitos T CD4-positivos. A introdução da HAART, a partir de 1996, tem trazido mudanças na incidência de muitas infecções oportunistas e em algumas neoplasias em pacientes com AIDS (SEPKOWITZ, 1998). Com a redução de diagnósticos de AIDS decorrentes de infecções oportunistas, tem havido um aumento de novos diagnósticos de AIDS associados a linfoma. Um estudo envolvendo 52 países da Europa verificou que 4% dos casos AIDS foram diagnosticados devido a linfomas, em 1994, contra 16%, em 1998 (MOCROFT, et al., 2000). LEDERGERBER, et al. (1999) demonstraram uma redução importante na incidência de sarcoma de Kaposi e de linfoma primário de SNC desde o início da utilização de HAART. O EUROSIDA (2001) fez um estudo multicêntrico com objetivo de avaliar a influência da HAART em LNH com AIDS (KIRK, et al., 2001). Este estudo envolveu 8.556 pacientes infectados pelo HIV de 63 centros em 20 países da Europa. A conclusão foi de que a incidência de LNH nestes pacientes diminuiu significativamente após a introdução da HAART sendo o declínio mais pronunciado nos linfomas plasmoblásticos. Neste estudo os pacientes com resposta imunológica e sorológica insuficientes a HAART apresentavam alto risco de desenvolver LNH quando comparados aos pacientes com resposta à terapia. Um estudo colaborativo internacional, em 47.936 indivíduos HIV positivos, nos EUA, Europa e Austrália, comparou pacientes diagnosticados no período de 1992-1996 com pacientes diagnosticados no período de 1997-1999 e mostrou uma redução na incidência de linfoma imunoblástico e primário de SNC neste

último período (INTERNATIONAL, 2000). EVISON, et al. (1999) demonstraram que pacientes com LNH usando HAART tendem a ter linfomas menos agressivos e maior sobrevida. NAVARRO et al. (2001) estudaram 58 pacientes com AIDS que fizeram o mesmo tratamento quimioterápico para LNH separados em dois grupos; o primeiro (grupo 1) daqueles pacientes que não receberam HAART e o segundo grupo (grupo 2) daqueles que permaneciam usando HAART, iniciado antes ou logo após o diagnóstico de LNH. A resposta à quimioterapia foi significativamente maior no grupo 2. A sobrevida livre de doença e a sobrevida global foi estatisticamente maior, após análise multivariada, naqueles em tratamento com HAART. Com o aumento na expectativa de vida trazido pela HAART, a tendência atual é a utilização de tratamentos mais agressivos para os pacientes com LNH e AIDS. Com a maior sobrevida dos pacientes com AIDS e LNH, após o tratamento inicial, o desafio atual é o manejo de pacientes com recidiva do linfoma, os quais devem ser considerados para tratamento de segunda linha (TIRELLI, et al., 2000).

No Brasil o acesso gratuito na rede de saúde pública a HAART, conhecido em nosso meio como “coquetel”, foi garantido em 1996 pela Lei 9.313/96. A disponibilização desta terapêutica causou no Brasil, à semelhança de outros países, expressiva redução na morbidade e mortalidade, bem como no número de internações hospitalares. Uma análise da sobrevida dos pacientes de AIDS maiores de 12 anos mostrou que a sobrevida mediana no período 1982-1989 que era de 6,1 meses elevou-se para 16 meses até 1995 e atingiu 58 meses para o ano de 1996 (PIO MARINS, et al., 2002). Faltam, no Brasil, estudos sobre o impacto da HAART na história natural do LNH nos pacientes com AIDS.

3. OBJETIVOS

GERAL

Comparar as características histológicas, imunofenotípicas e a associação viral com o EBV dos Linfomas não-Hodgkin diagnosticados em pacientes HIV-positivos e negativos nos serviços de anatomia patológica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) e Hospital Aristides Maltez e/ou acompanhados nos diversos serviços de oncologia em Salvador entre janeiro de 1998 a março de 2003.

ESPECÍFICOS

Comparar as características histológicas e imunofenotípicas dos LNH de pacientes HIV positivos e negativos classificando-os de acordo com a OMS 2001

Observar a frequência da infecção EBV no tecido tumoral destes linfomas utilizando a técnica de hibridização *in situ* para o RNA nuclear do EBV (EBER-1 e 2)

Determinar o tipo de latência viral do EBV através da detecção de antígenos virais (LMP 1, EBNA 2) no tecido tumoral dos LNH de pacientes HIV -positivos e HIV-negativos.

Analisar, através da revisão dos prontuário dos pacientes, alguns parâmetros clínicos e laboratoriais como: idade, sexo, estadiamento clínico do linfoma, contagem de CD4 e valor sérico da desidrogenase láctica

4. JUSTIFICATIVA

A AIDS é uma doença cosmopolita e ainda em franca ascensão do mundo. Até dezembro de 2002, tinham sido notificados 257.771 casos de AIDS no Brasil, 9% destes, aproximadamente, na região nordeste. A Bahia foi responsável por um quarto destes casos, 61,4% ocorrendo na cidade de Salvador, o que torna esta cidade uma importante fonte de novos casos (DADOS, 2002). A infecção pelo HIV têm influência negativa no crescimento econômico, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Os efeitos deletérios desta pandemia atingem os campos social, econômico e cultural (PIOT, et al., 2001). Por isto, estudos que contribuam para o conhecimento da realidade dos pacientes com AIDS e patologias associadas ao HIV nestes países, devem ser continuamente estimulados.

Os pacientes infectados pelo HIV têm um risco aumentado de apresentarem neoplasias malignas, incluindo linfomas (DAL MASO, et al., 2001; GOEDERT, 2000). A alta incidência de LNH em pacientes HIV-positivos quando comparada à população geral, levou ao CDC a incluir esta patologia como critério diagnóstico de AIDS. O LNH é a segunda neoplasia mais incidente em pacientes com AIDS, sendo um importante fator de morbidade e mortalidade nestes pacientes (DAL MASO & FRANCESCHI, 2003). Desde que LNH pode ser a primeira manifestação da doença, a sorologia para HIV passou a ser recomendado como parte da rotina nos exames laboratoriais em LNH (BESIEN, K.V. & CARBANILLAS, F., 2000). O reconhecimento desta associação é muito importante, visto que, estes linfomas são geralmente muito agressivos e se faz necessário o tratamento das duas condições, AIDS e o linfoma.

Os linfomas ocorrendo em pacientes HIV-positivos parecem exibir características morfológicas e patogênicas distintas dos LNH ocorrendo em HIV- negativos (KNOWLES & PIROG, 2001). Isto levou a necessidade de uma classificação dos LNH ocorrendo em

pacientes HIV+ em separado dos linfomas ocorrendo na população em geral. Este novo capítulo foi acrescido na classificação internacional de linfomas, publicada pela OMS em 2001 (JAFFE, 2001). O uso desta classificação tem demonstrado diferenças clínicas e patológicas entre os linfomas em pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos, bem como uma variação geográfica quanto a frequência dos diferentes subtipos de linfomas, principalmente em pacientes imunocompetentes. Esta variação geográfica, verificada tanto em pacientes imunocompetentes quanto em imunossuprimidos, ratifica a necessidade de estudos comparativos de LNH em pacientes HIV-negativos e positivos procedentes de uma mesma região.

A melhor compreensão dos linfomas em pacientes com AIDS tem se mostrado um excelente modelo na elucidação da relação entre a formação de tumores, a imunovigilância e a relação entre neoplasias e vírus (CARBONE, 2003). Uma característica peculiar dos linfomas em pacientes HIV-positivos é a alta frequência de infecção pelo EBV. Entretanto, nos países em desenvolvimento, inclusive no nosso meio, uma alta frequência de infecção pelo EBV foi descrita em pacientes HIV-negativos com linfoma, no grupo pediátrico (ARAÚJO, 1999). Adicionalmente o EBV é um agente que está relacionado com linfomas ocorrendo tanto em pacientes HIV-positivos quanto HIV-negativos. Este fato contribui para a necessidade de estudos comparativos de diferentes grupos de pacientes, provenientes de uma mesma área geográfica, em relação à associação da infecção pelo EBV nos LNH.

A associação entre EBV e LNH tem sido bastante estudada no mundo, entretanto, existem escassas publicações sobre este assunto no Brasil, sobretudo em pacientes HIV-positivos (BACCHI, 1996). A realização deste estudo será útil para que possamos conhecer mais sobre a prevalência de co-infecção pelo EBV em pacientes com LNH HIV-positivos, diagnosticados no nosso meio. Estudos atuais que visam o conhecimento dos diversos aspectos da relação

entre EBV e LNH, podem, no futuro, ser úteis e servir como base para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas, direcionadas contra o EBV (NIEDOBITEK, et al 2001).

Motivados pela escassez de dados sobre o assunto em nosso meio, decidimos investigar comparativamente linfomas ocorrendo em pacientes HIV- positivos e negativos em Salvador-Bahia, analisando seus aspectos histológicos e imunofenóticos; classificando-os conforme a classificação OMS-2001; avaliando algumas variáveis clínicas e laboratoriais e a associação destes LNH com a infecção EBV.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

5.1.1 Seleção de Casos (HIV-positivos)

Quatro estratégias distintas foram utilizadas na identificação dos pacientes HIV-positivos com diagnóstico de linfoma: 1) revisão de todos os prontuários com laudos anatomo-patológicos de LNH do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES) e Hospital Aristides Maltez (HAM); 2) revisão dos prontuários de todos os LNH acompanhados no Núcleo de Oncologia da Bahia (NOB); 3) entrevista verbal com hematologistas e/ou oncologistas nas clínicas AMO, CEHON, ONCO (pediátrica e adulto) e nos serviços de oncologia adulto e pediátrico do Hospital Santa Isabel e Hospital São Rafael e 4) entrevista verbal com infectologistas envolvidos no atendimento de paciente com AIDS em nos Hospitais Espanhol, Português e Hospital Central Roberto Santos.

No HUPES e HAM foram revisados os prontuários de 230 pacientes com diagnóstico de LNH, no período de janeiro de 1998 a fevereiro de 2003, identificados a partir dos laudos anatomo-patológicos de biópsia emitidos nestes hospitais. No HUPES foram incluídos adicionalmente prontuários de 23 pacientes HIV-positivos, submetidos a necrópsia, no mesmo período. No NOB foram revisados 49 prontuários correspondendo a todos os casos de LNH diagnosticados neste período. O HUPES, HAM e o serviço estadual de oncologia (CICAN) foram em conjunto considerados neste estudo, como “serviços da rede pública” por atenderem exclusivamente pacientes do sistema único e saúde (SUS) e todos os demais serviços citados foram em conjunto denominados “serviços da rede privada”.

Foram considerados HIV-positivos os pacientes que tinham em prontuário pelo menos um laudo de sorologia repetidamente positiva para o HIV, confirmada ou não por um outro método laboratorial ou, pelo menos, relato em prontuário de diagnóstico de AIDS e do uso de terapia anti-retroviral direcionada para o HIV ou que estavam matriculados em serviços de referência para atendimento de AIDS.

5.1.2 Seleção de Controles (HIV-negativos)

Os controles foram obtidos tanto da rede pública como privada. Os controles provenientes da rede pública foram obtidos a partir dos 230 prontuários de LNH identificados no HUPES e HAM. Os controles da rede privada foram obtidos da revisão dos prontuários dos pacientes acompanhados no NOB. Selecionamos como controles, todos os pacientes com LNH que possuíam laudo de sorologia negativa para HIV no prontuário nestes três serviços. Critérios de exclusão incluíram: material insuficiente para o estudo ou não encontrado no arquivo (2) e sorologia positiva para HTLV-1 por tratar-se de material de pesquisa já em curso. Separamos os blocos de parafina referentes ao tecido tumoral do diagnóstico de LNH destes pacientes que estavam disponíveis nos serviços de anatomia patológica para estudo. Foi obtido material de 30 pacientes HIV-negativos que serviram como grupo controle.

5.2 COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

No laudo anatomopatológico dos pacientes do HUPES e HAM foram colhidas as informações iniciais sobre o nome completo do paciente, registro hospitalar, subtipo de linfoma. A seguir, foram analisados os prontuários destes pacientes à procura de informações adicionais, no mesmo período do diagnóstico do LNH: sexo, idade, valor da LDH e do CD4, número do estudo imunohistoquímico do LNH e sorologia para HIV e/ou relato médico de diagnóstico

de AIDS. Nos casos do CICAN e da rede privada, partiu-se inicialmente da revisão dos prontuários para obter todas as informações clínico/laboratoriais acima listadas e também laudos anatomopatológicos e de imunoistoquímica. Foram avaliados quando disponíveis, os exames de imagem do diagnóstico e o laudo histopatológico de biópsia de medula óssea com o intuito de confirmar e/ou obter o estadiamento clínico dos LNH conforme os critérios de Ann Arbor (ROSENBERG,1977).

5.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Foram obtidas lâminas coradas em hematoxilina-eosina para revisão histológica. Quando a lâmina não foi encontrada ou estava em precário estado de conservação, novos cortes com espessura de 3mm, foram realizados a partir dos blocos de parafina. e corados pela hematoxilina-eosina.

5.4 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO (IHQ)

Quando disponíveis as lâminas de IHQ foram revisadas, quando não disponíveis, novos cortes histológicos de 4 µm dos blocos de parafina do tecido tumoral dos casos selecionados foram feitos, montados em lâminas previamente tratadas com solução sulfocrômica e passadas em solução adesiva de cola Cascorez a 5%, e submetidos ao procedimento de imunoistoquímica para posterior revisão. Foi empregada a técnica da streptavidina-biotina-peroxidase (BOENISH, T., 1989), **Anexo**.

Foram utilizados anticorpos monoclonais ou policlonais (marcadores) disponíveis comercialmente. Todos os anticorpos utilizados foram da marca DAKO. A especificidade e origem dos anticorpos estão listados na **Tabela 5**:

- Marcadores para células B : CD20 e CD 79^a
- Marcadores para células T : CD3, CD45RO (OPD4, UCHL1)
- Marcador de proliferação celular : MIB1
- Marcador para antígenos virais do EBV: LMP-1 e EBNA-2
- Marcadores para plasmócitos: CD38

Tabela 5 : Anticorpos a serem usados para imunoistoquímica

Anticorpo	Clone	Especificidade	Diluição
EBNA-2	PE2	EBNA-2	1:50
LMP-1	CSI-4	LMP-1	1:25
CD3	Policlonal	Linfócito T	1:100
CD 45RO	UCHL-1	Linfócito T	1:100
CD 30	Ber-H2	Antígeno Ki-1	1:40
CD20	L 26	Linfócito B	1:100
CD 38	VS 38c	Plasmócito	1:25
CD 79 ^a	JCB 117	Célula B	1:50
K1 67	Ki- S5	Proliferação Celular	1:25

5.4.1 Procedimento de Imunoistoquímica

As secções histológicas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol durante 5 minutos cada, desidratadas em dois banhos de álcool absoluto por 3 minutos e então hidratadas em água corrente e destilada e posteriormente colocadas em tampão PBS. A recuperação

antigênica foi feita em calor úmido, colocando as lâminas submersas em tampão citrato pH 6.0 em panela de pressão (*WMF perfect german*) durante 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído no reagente da DAKO (diluidor de anticorpo) conforme diluições previamente padronizadas (**Tabela 5**), por 40 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, após lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, Ig de coelho anti-IgG de camundongo biotilado, na diluição 1:300 (DAKO,US) para anticorpos monoclonais e Ig de suíno anti-IgG coelho biotilado, na diluição 1:600 (DAKO,US) para anticorpos policlonais, por 30 minutos a 37°C. Após lavagens com PBS, seguiu-se a reação sendo incubado as lâminas com a streptoavidina peroxidase na diluição 1:50 (DAKO,US), por 30 minutos a 37°C.

A revelação foi obtida com o cromógeno 3'3'diaminobenzidina (DAB) e o peróxido de hidrogênio (Vector Inc, Burlingame, EEUU – Kit) como substrato da peroxidase. A reação foi interrompida com lavagens em água corrente. Os cortes histológicos foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados em álcool absoluto, clarificados em xilol e recobertos com lamínulas de vidro sob bálsamo do Canadá.

5.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Foi realizada no Instituto de Patologia da Universidade Livre de Berlim. Teve como objetivo detectar a infecção pelo Epstein-Barr no tecido tumoral. Os cortes histológicos foram submetidos à técnica de hibridização *in situ* de acordo com protocolo descrito a seguir. Foram utilizadas sondas de RNA nuclear não codificante do EBV (EBER) 1 e 2, marcados com digoxigenina. Esta técnica permite a detecção do transcrito de RNA do EBV, possibilitando a localização da células infectadas no tecido. Três passos fundamentais foram seguidos nesta técnica :

1. Obtenção da sonda através de transcrição *in vitro* utilizando UTP marcado com digoxigenina

Em tubo de 1,5 ml foi colocado 1µl de digoxigenina-rUTP , 4µl de tampão de transcrição (BRL), 2µl de 10mM rNTP (rATP, rGTP, RCTTP), 1µl de RNAsin, 9µl de Depc-H₂O, 1 µl do plasmídeo linearizado(1µg/µl) (EBER-1 ou EBER-2) e 2µl da polimerase correspondente. Seguiu-se um período de incubação de 90 minutos a 37^o C, com adição de 1 µl da polimerase após os primeiros 60 minutos. No final a transição foi controlada pela realização de um minigel de agarose. As sondas de RNA marcadas foram então aliquotadas e estocadas a -80^o. C. Os plasmídios possuindo o fragmento de DNA encontram-se especificados na **Tabela 6**.

Tabela 6 : cDNA usados para Hibridização *in situ*

Nome	Clonado em:	RE	TP	Tamanho	cDNA
EBER-1	pBlueKS	Hind III	T7	0,5	Anti-sense
EBER-1	pBlueKS	EcoRI	T3	0,5	Sense
EBER-2	pBlueKS	BamHI	T3	0,5	Anti-sense
EBER-2	pBlueKS	EcoRI	T7	0,5	Sense

Abreviações : RE: Enzima de restrição , TP: Promotor para transcrição

2. Tratamento do tecido antes da hibridização

Cortes de 4µm de espessura foram desparafinizados e reidratados sequencialmente em xilol e álcool progressivamente (99%, 90% , 70% e 50%). Depois os cortes foram tratados como descrito a seguir: 10 minutos em 0,2N HCl/Depc-H₂O; 5 minutos 1xPBS; 10 minutos em

0,625 mg Pronase/ml em 1xPBS; 30 segundos em Glicina 0,1M em 1xPBS; três banhos 1xPBS; 10 minutos em 4%PFA /1xPBS a 4°C, 3 minutos em 1xPBS seguido por desidratação progressiva em etanol (30%,60%,90%,100%/Depc-H₂O). A seguir as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente para secar por 15 minutos.

3. Hibridização e lavagens após hibridização

Para cada lâmina foram usados 30 µl da mistura de hibridização contendo 0,1µl de cada sonda (EBER-1 e 2). Esta mistura continha 50% de formamida (deionizada); 12,5% de sulfato de dextran; 10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; 0,3M NaCl; 5mM EDTA; 1 x solução de Denhardt; 1,2 mg/ml de tRNA de fungo e sonda marcada com digoxigenina. Para preparar esta mistura de sondas foram inicialmente diluídas em formamida a 50% e Depc-H₂O e desnaturadas por 3 minutos em banho Maria a 80°C, misturadas com 4 partes do tampão de hibridização e homogeneizada. Trinta microlitros da mistura foram colocados sobre a lâmina a qual foi a seguir, coberta com parafilme. Para hibridização, as lâminas foram colocadas em câmeras contendo 50% de formamida/Depc-H₂O e incubadas a 37°C por 2 horas. Após hibridização, as lâminas foram lavadas em solução salina (2xSSC) por 10 minutos a 48°C, 1xSSC por 10 minutos a 48°C para remoção da sonda ligada inespecificamente. Finalmente, a digoxigenina foi detectada através de método imunohistológico com utilização de anticorpo específico para digoxigenina conjugada a molécula de fosfatase alcalina a qual foi revelada, pelo mesmo principio do método Streptoavidina-biotina-peroxidase. As lâminas foram posteriormente, coradas com hematoxilina de Mayer e as lamínulas montadas com bálsamo. Para cada secção hibridizada com sonda anti-*sense* (complementar à molécula que se quer demonstrar) foi paralelamente hibridizada uma secção do mesmo material com uma sonda *sense* (não complementar), funcionando como controle negativo.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realização das análises estatísticas utilizamos o software SPSS versão 11.0. Na análise dos dados não-paramétricos dicotômicos foram utilizados os testes do qui-quadrado e o de probabilidades exato de Fischer. Este último foi usado quando a amostra em uma das caselas foi inferior a 5. O valor de p foi considerado significativo quando $< 0,05$. A razão de produtos cruzados (razão de chances ou *odds ratio* (OR)) foi calculada e foi considerado o intervalo de confiança (IC) de 95%.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS GRUPOS

Dos 17 casos de LNH ocorrendo em pacientes infectados pelo vírus HIV estudados, nove (52,92%) foram obtidos na rede pública e oito na rede privada (47,1%) de atendimento, enquanto do grupo HIV-negativo 18/30 (60%) eram da rede pública e 12 da rede privada (40%) ($p = 0,761$). A distribuição quanto ao sexo foi similar em ambos os grupos, sendo que no grupo HIV-positivo a relação homem/mulher foi de 1,8:1 e no grupo HIV-negativo 2:1 ($p = 1,0$). A idade média do grupo HIV-positivo foi de 41 anos ($\pm 8,5$) enquanto no grupo controle foi de 53,4 ($\pm 18,5$) ($p = 0,01$).

6.2 DIAGNÓSTICO DO HIV

No grupo HIV-positivo o diagnóstico da infecção ocorreu:

- antes do diagnóstico do linfoma não-Hodgkin em 10 casos (58,8%). O intervalo de tempo entre o diagnóstico da infecção pelo HIV e o de LNH foi em média de 15,1 meses, variando de um a 84 meses.
- concomitante ao diagnóstico de LNH em quatro pacientes (23,5%)
- após o diagnóstico de LNH em três casos (17,6%). O intervalo nestes casos entre o diagnóstico de LNH e o de infecção pelo HIV foi em média de três meses, variando de um a cinco meses.

No grupo HIV-positivo a infecção pelo HIV foi diagnosticada por pelo menos dois exames de sorologia ELISA para HIV-1 e HIV-2 em 14 pacientes. Destes, 13 foram confirmados pelo *Western Blot*. Em três pacientes havia apenas o relato em prontuário de que se tratava de paciente HIV-positivo, sendo que um destes estava em uso de terapia anti-retroviral. Nos

prontuários destes três pacientes, no entanto, não constavam laudos de exames para detecção do HIV.

No grupo HIV-negativo todos os pacientes possuíam pelo menos um exame de ELISA para HIV-1 e 2 negativo no prontuário.

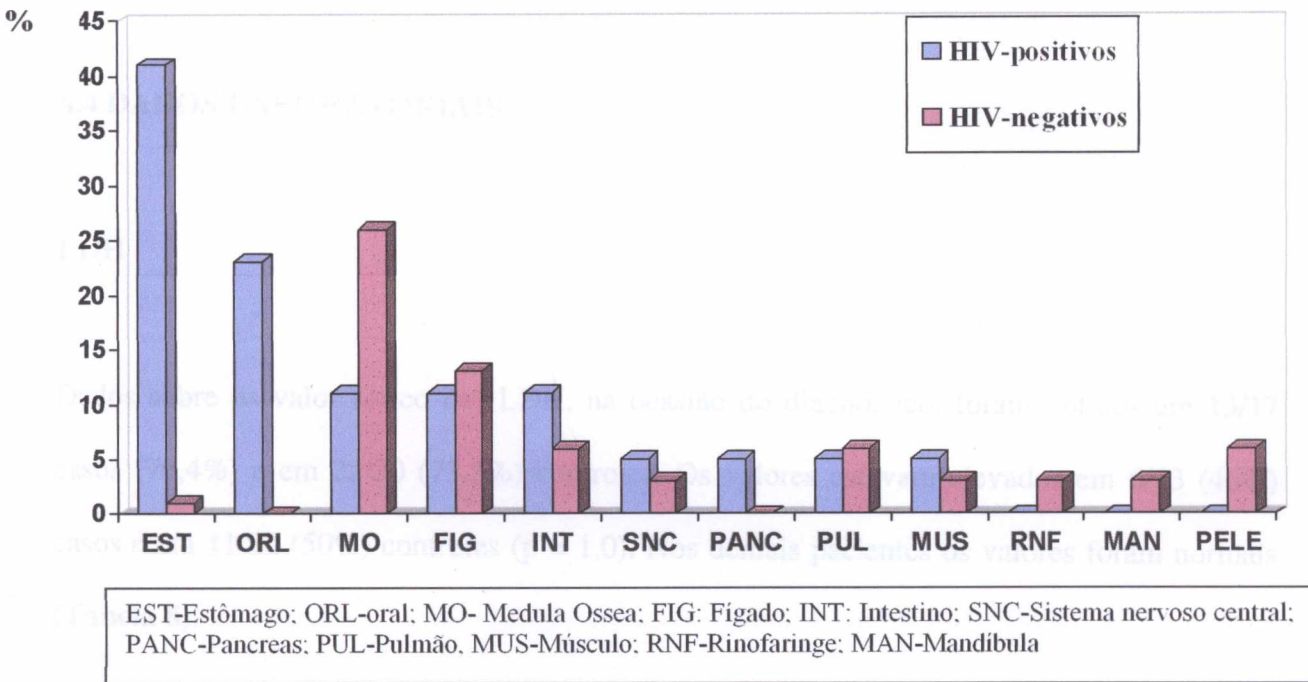
6.3 DADOS CLÍNICOS DOS LNH

6.3.1 Sítio de Acometimento

O comprometimento exclusivo de linfonodos (nodal) foi encontrado em quatro dos 17 casos HIV-positivos (23,5%) e em cinco de 29 (17,2%) no grupo controle. O acometimento extranodal foi documentado por exame anatomo-patológico e/ou exame de imagem ou endoscópico em 13 casos (76,5%) HIV-positivos, enquanto este acometimento foi observado em 24/29 (82,8%) pacientes do grupo controle ($p = 0,707$). No grupo HIV-positivo o sítio extranodal foi acometido primariamente (LNH extranodal) em 12/13 casos (92%) enquanto no grupo HIV-negativo este acometimento primário foi observado em 10/24 (41,6%) pacientes ($p = 0,004$). Nos demais pacientes, 1 do grupo HIV-positivo e 14 do grupo HIV-negativo, o acometimento extranodal foi secundário (disseminação). O acometimento de mais de um sítio extranodal foi observada em cinco casos (29,4%) e em três controles (10%) ($p = 0,118$). Nos casos HIV-positivos o estômago estava comprometido em sete casos, cavidade oral em quatro, intestino em dois, fígado em dois casos, medula óssea em dois casos, sistema nervoso central em um caso, pulmão em um caso e pâncreas em um caso. Havia comprometimento por contiguidade do músculo masseter em um caso com sítio primário em cavidade oral. No grupo HIV-negativo o principal sítio de acometimento extranodal foi a medula óssea com oito pacientes, seguido pelo fígado em quatro; estômago em três; intestino, pele e pulmão comprometidos dois casos cada um; sistema nervoso central,

rinofaringe , mandíbula e músculo em um caso cada um. Um paciente deste grupo com comprometimento primário de intestino mostrava invasão por contiguidade de útero, ovário e omento. (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição quanto ao sítio de acometimento extra-nodal dos LNH nos pacientes HIV-positivos e HIV-negativos



6.3.2 Estadiamento Clínico

Foi possível a obtenção segura do estadiamento clínico em 12/17 (70,5%) dos pacientes HIV-positivos e em 24/30 (80%) pacientes HIV-negativos. Estes foram classificados conforme os critérios de Ann Arbor (ROSENBERG, S., 1977). O estadiamento avançado (III e IV), foi observado em 7/12 casos (58,3%) e em 20/24 (83%) pacientes do grupo controle ($p = 0,126$). A comparação dos grupos quanto ao estadiamento está exposta na tabela 7.

Tabela 7: Estadiamento dos pacientes HIV-positivos e negativos com LNH

ESTADIAMENTO	HIV-positivos	HIV-negativos
I	3/12 (25,0%)	0
II	2/12 (16,6%)	4/24 (16,6%)
III	2/12 (16,6%)	2/24 (8,3%)
IV	5/12 (41,6%)	18/24 (75%)

6.4 DADOS LABORATORIAIS

LDH

Dados sobre os valor sérico da LDH, na ocasião do diagnóstico, foram obtidos em 13/17 casos (76,4%) e em 22/30 (73,3%) controles. Os valores estavam elevados em 6/13 (46%) casos e em 11/22 (50%) controles ($p = 1,0$). Nos demais pacientes os valores foram normais (Tabela 8).

CD4

Em onze dos dezessete casos (64,7%) foi possível a obtenção dos valores do CD4 na ocasião do diagnóstico do LNH; em oito (72,7%) a contagem de CD4 foi abaixo de 200 células/mm³ (Tabela 8). Nos pacientes HIV-negativos este dado não existia em prontuário.

Tabela 8 – Características gerais, estadiamento clínico e dados laboratoriais dos LNH em HIV positivos

Nº CASO	SEXO	IDADE (anos)	ESTÁDIAMENTO (Ann Arbor)	LDH* (U/dl)	CD4 (cél/s/mm3)
01	F	35	III B (?) ¹	144 (N) ²	-
02	M	46	I E	436 (N)	72
03	F	49	I E	-	-
04	M	29	IV B	142 (N)	64
05	M	51	III	957 (↑) ³	198
06	M	30	II A	436 (N)	176
07	F	46	IV	3.520 (↑)	216
08	M	37	IV	490 (↑)	35
09	M	33	IV	285 (↑)	-
10	M	39	II A (?)	-	127
11	F	28	II A	148 (N)	98
12	M	38	I E (?)	662 (↑)	-
13	F	57	-	311 (N)	-
14	F	38	IV	-	-
15	M	47	III E	345 (N)	302
16	M	49	I E (?)	460 (↑)	140
17	M	46	I E	-	342

* os valores de referência variaram a depender da instituição onde o exame foi realizado

1. (?) os dados obtidos em prontuário foram insuficientes para uma avaliação segura do dado

2. (N) normal

3. (↑) alto

6.5 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS DOS LNH

Dos dezessete casos, 16 foram classificados de acordo com a publicação da OMS-2001 (Jaffet et al., 2001) e em um caso, o estudo imunoistoquímico resultou insatisfatório mesmo após repetições, por este motivo, o caso foi considerado não classificado. No grupo controle só foi possível a classificação segundo a OMS-2001 em 28 pacientes. Quanto ao fenótipo, todos os casos exibiam fenótipo B (100%), enquanto do grupo controle 23 (82,1%) foram B, quatro (14,2%) T e um tinha o fenótipo nulo. No grupo HIV-positivo, dez dos dezessete (62,5%) casos foram classificados como Linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) dos quais nove pertenciam a variante centroblastica (LDGCB-C) e um a variante imunoblastica (LDGCB-I) (Figura 3). Quatro casos (25%) foram classificados como Linfoma de Burkitt (LB) dos quais, dois foram classificados como LB clássicos, um como LB atípico e outro como LB com diferenciação plasmocitóide (Figura 3); dois casos (12,5%) foram classificados como Linfoma plasmoblastico (LPB). Dos 23 controles com fenótipo B, 16 (59,2%) foram classificados como LDCG, sendo que 15 pertenciam a variante centroblastica e um a variante rico em células T. Dos 7 linfomas de células B restantes um foi classificado como LB com diferenciação plasmocitóide (Figura 4), um como LNH tipo folicular com áreas difusas e cinco (18,5%) como linfoma linfocítico. Dos quatro linfomas de células T, dois foram classificados como linfoma T periférico não especificado, um como linfoma T tipo paniculite subcutânea, um como micose fungóide. O paciente com imunofenótipo nulo foi classificado como linfoma anaplásico de grandes células. O índice de proliferação celular utilizando o marcador K1 67 (MIB) foi, em média 79% ($\pm 18,5$) nos casos e 55% (± 28) nos controles, sendo esta diferença significativa ($p = 0,02$).

Figura 3: Aspectos histopatológicos dos LNH em pacientes HIV-positivos

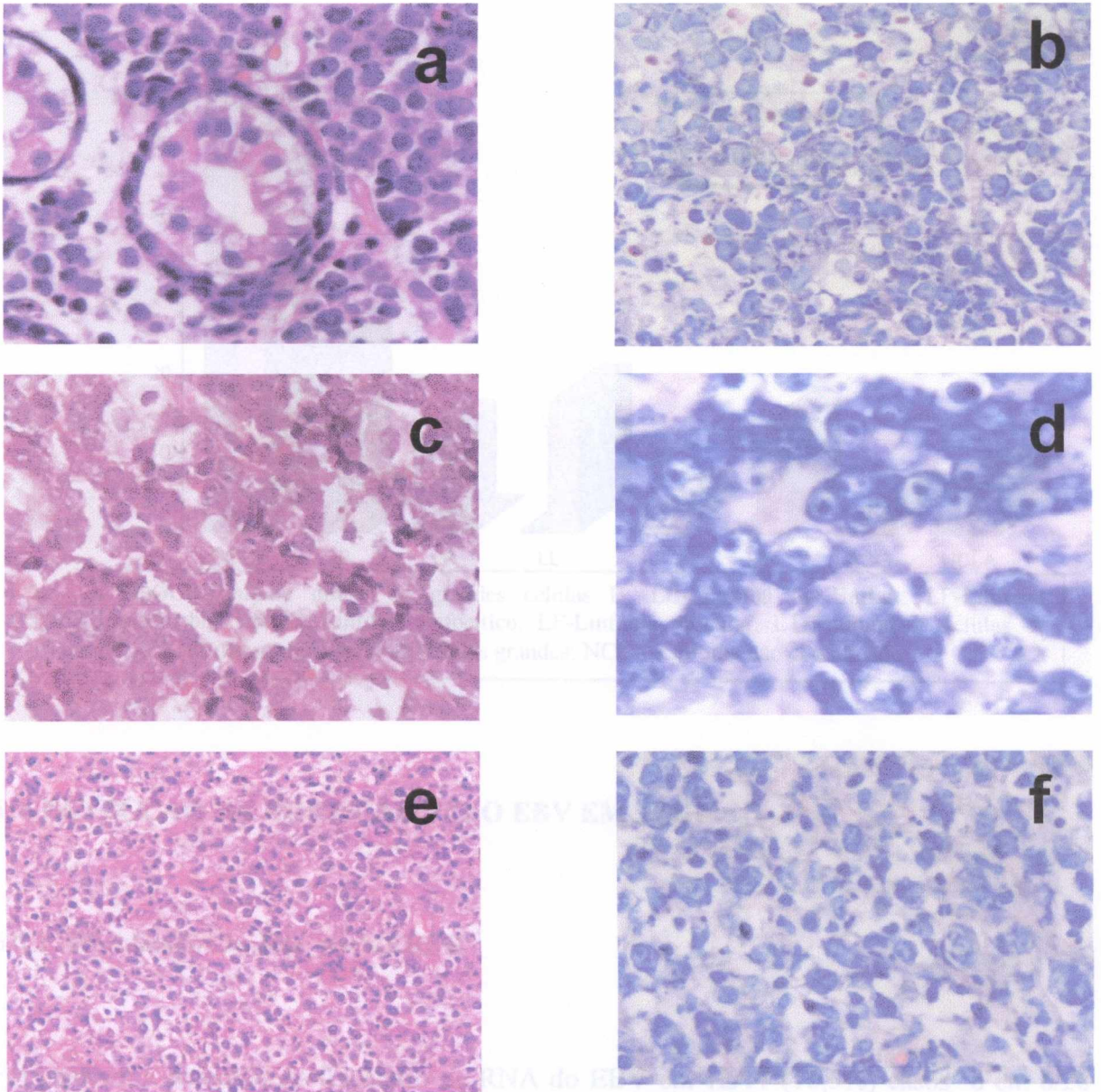
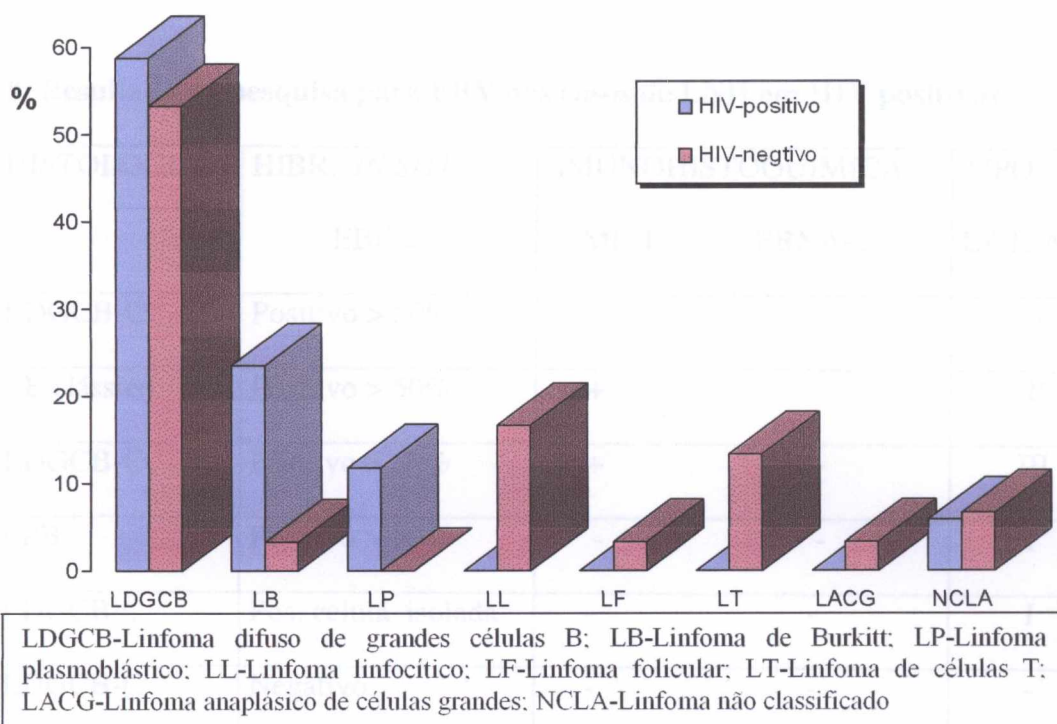


Figura 3: a) Caso 2- Linfoma de Burkitt clássico, comprometendo mucosa gástrica, observar glândula no centro (seta) envolvida pelas células neoplásicas (coloração H&E 250X); b) Caso2 (LB) células linfóides de tamanho médio com macrófagos de permeio conferindo aspecto de “céu estrelado” (coloração Giemsa 300X); c) Caso 7-LDGCB-I, células grandes com macrófagos fagocíticos de permeio (coloração H&E 250X); d) Caso 7-LDGCB-I detalhe das células grandes com nucléolo central, proeminente (coloração Giemsa 400X); e) Caso 5-LDGCB-C, Células grandes de distribuição difusa (coloração H&E, 250X); f) Caso 5-LDGCB-C Células grandes com núcleos de cromatina frouxa, vários nucléolos e numerosas células apoptóticas de permeio (coloração Giemsa, 400X).

Gráfico 2: Distribuição dos subtipos histológicos de LNH no grupo HIV-positivo e negativo em percentagem



6. 6 DETECCAO DA INFECCAO PELO EBV EM LNH

6.6.1 Hibridização *in Situ* para EBER

Foi possível a detecção do transcrito de RNA do EBV em 12/17 (70,5%) casos e em 6/28 (21,4%) controles ($p = 0,002$, OR 8,8; IC (95%): 2,215 - 34,965). Dos 12 casos positivos cinco eram LDGCB-C, um LDGCB-I, três LB, dois LPB e um caso foi do LNH não classificado (Figura 2). Em relação aos subtipos histológicos a proporção que o EBV foi detectado por este método foi de 55,5% dos LDGCB-C, 100% dos LDGCB-I, 75% dos LB, e 100% dos LPB. (Tabela 9). Dos seis pacientes do grupo controle positivos para EBER, quatro foram classificados como LDGCB, destes três da variante centroblastica e um rico em

células T; um caso foi de LB com diferenciação plasmocitóide e um de linfoma T Periférico não especificado (**Tabela 9**).

Tabela 9: Resultado da pesquisa para EBV nos casos de LNH em HIV positivos

Nº	HISTOLOGIA	HIBR. <i>IN SITU</i> EBER	IMUNOHISTOQUIMICA		TIPO DE LATÊNCIA
			LMP-1	EBNA-2	
01	LDGCB-C	Positivo > 50%	-	-	I
02	LB clássico	Positivo > 50%	+	-	II
03	LDGCB-C	Positivo > 50%	+	+	III
04	LPB	Positivo > 50%	-	-	I
05	LDGCB-C	Pos. célula isolada	-	-	I
06	LDGCB-C	Negativo	-	-	-
07	LDGCB-I	Positivo > 50%	+	-	II
08	LDGCB-C	Negativo	-	-	-
09	Não Classificado	Positivo > 50%	+	-	II
10	LBplasmocitóide	Positivo 100%	-	-	I
11	LDGCB-C	Pos. célula isolada	-	-	I
12	LDGCB-C	Negativo	-	-	-
13	LB clássico	Negativo	-	-	-
14	LDGCB-C	Negativo	-	-	-
15	LB atípico	Positivo >50%	+	+	III
16	LPB	Pos. célula isolada	-	-	I
17	LDGCB-C	Positivo < 50%	-	-	I

(+) positivo (-) negativo; LDGCB-C: Linfoma difuso de grandes células B, centrolástico; LDGCB-I : Linfoma difuso de grandes células B, imunoblástico; LB: Linfoma de Burkitt; LPB: Linfoma Plasmoblástico

O número de células neoplásicas positivas variou de raras a 100% das células (Figura 2). Observou-se diferença quanto ao percentual de células positivas para EBV no tecido tumoral em ambos os grupos. Em 8/12 casos (66,6%) o percentual de células tumorais positivas foi superior a 50% enquanto nos controles apenas 1/6 (16,6%) com diagnóstico de linfoma de Burkitt exibiu este padrão de positividade. Tal diferença, no entanto, não atingiu significância estatística ($p = 0,131$). Em 5/6 controles (83,3%), a porcentagem de células positivas para EBER foi inferior a 50%, sendo que a maioria destes apresentavam apenas raras células isoladas positivas. Quando o linfoma era de pequenas células, tornou-se muito difícil determinar morfológicamente se as células eram neoplásicas ou reacionais (**Tabela 10**).

Tabela 10: Dados dos pacientes com LNH do grupo controle HIV negativos

SEXO/ IDADE	CLASSIFICACAO	HIBRIDIZAÇÃO IN SITU (EBER)	IMUNOISTOQUIMICA		LATÊNCIA
			LMP-1	EBNA-2	
M / 44	LDGCB rico em células T	Pos. célula isolada	-	-	I
M / 47	LDGCB-C (B)	Pos. célula isolada	-	-	I
M / 73	LDGCB-C (B)	Pos. célula isolada	-	-	I
M / 63	LNH T periférico não especificado	Positivo < 50%	+	-	II
M / 55	LDGCB-C (B)	Positivo < 50%	+	+	III
F / 18	LB c/ diferenciação plasmocitóide (B)	Positivo >50%	-	-	I

(+) positivo (-) negativo; LDGCB-C: Linfoma difuso de grandes células B, centroblástico; LNH T : Linfoma não

Hodgkin T; LB: Linfoma de Burkitt

Figura 4: Aspectos imunofenotípicos dos LNH em pacientes HIV-positivos

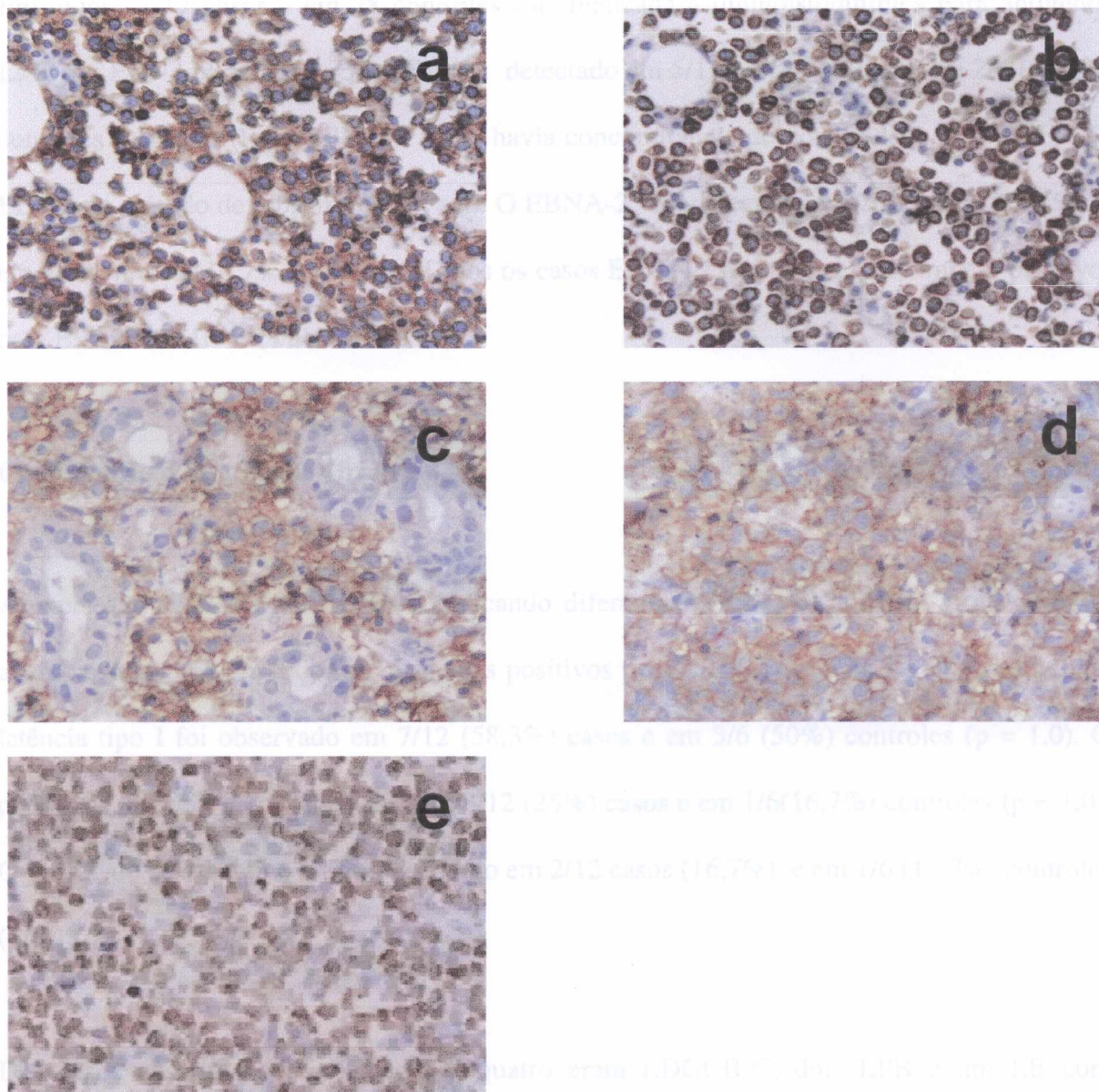


Figura 4: Imunoistoquímica pela técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase a) Caso 10 -Linfoma de Burkitt plasmocitóide: células linfoides neoplásicas de tamanho médio com forte expressão de CD20 (marrom); b) Caso 10, Linfoma de Burkitt plasmocitóide: células linfoides neoplásicas com forte expressão citoplasmática do CD79a; c) Caso 12, Linfoma difuso de grandes células B com forte expressão membranar do CD20 (marrom) em células atípicas grandes que dissociam glândulas gástricas negativas; d) Caso 04 -Linfoma plasmoblástico: expressão do marcador de diferenciação plasmocitóide (VS38c); e) Caso10 marcador de proliferação celular MIB1 em aproximadamente 90% das células neoplásicas (marcação nuclear em marrom) (Aumentos 150X, 150X, 300X, 400X, 300X)

6.6.2 Imunoistoquímica para EBV

Em todos os 17 casos e em 28 controles foi realizada a imunoistoquímica para antígenos LMP-1 e EBNA-2 do EBV. O LMP-1 foi detectado em 5/12 casos (41,7%) e em 2/6 (33,3%) controles ($p = 1,0$) (Figura 3). Em todos havia concomitância de positividade para EBER do EBV pelo método de hibridização *in situ*. O EBNA-2, foi detectado em 2/12 casos (16,7%) e em 1/6 controles(16,7%) ($p = 1,0$). Todos os casos EBNA-2 positivos eram também positivos para EBER e LMP-1. (Tabelas 9 e 10).

6.6.3 Padrão de Latência Viral

A expressão de LMP-1 e EBNA-2 indicando diferentes padrões de latência viral, permitiu avaliar este padrão em todos os pacientes positivos para EBER (Tabelas 8 e 9). O padrão de latência tipo I foi observado em 7/12 (58,3%) casos e em 3/6 (50%) controles ($p = 1,0$). O padrão de latência II foi observado em 3/12 (25%) casos e em 1/6(16,7%) controles ($p = 1,0$). O padrão de latência tipo III foi observado em 2/12 casos (16,7%) e em 1/6 (16,7%) controles ($p = 1,0$).

Dos casos descritos como latência I, quatro eram LDGCB-C, dois LPB e um LB com diferenciação plasmocitóide. Dos três casos com padrão de latência II, um foi o LDGCB-immunoblástico, um LB clássico e um LNH não classificado. Dos casos com latência III um era um LDGCB-C e o outro LB atípico. Dos controles descritos como latência I três eram LDGCB- variante centroblastica e um era LB com diferenciação plasmocitóide. O indivíduo com latência II era um Linfoma T periférico e o com latência III era um LDGCB-centroblastico.

FIGURA 5: Detecção da infecção pelo EBV em tecido pela hibridização *in situ* e pela imunohistoquímica

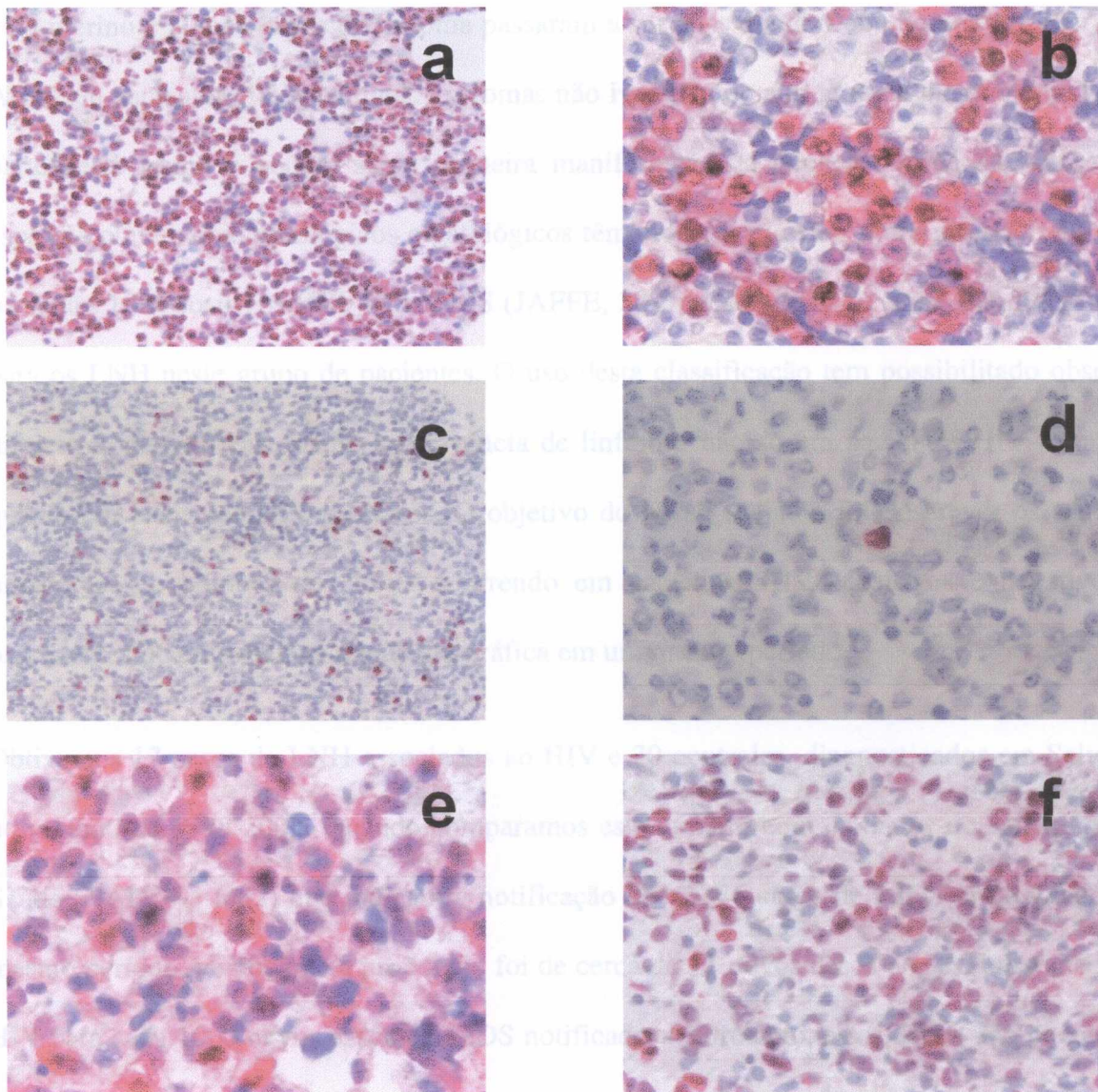


Figura 5: a-d) hibridização *in situ* para EBER 1 e 2: a) Caso 10-Linfoma de Burkitt, forte positividade nuclear (vermelho) em virtualmente 100% das células neoplásicas; b) Caso 4 - Linfoma plasmoblástico, forte positividade nuclear em mais de 50% das células; c) Caso 1- Linfoma difuso de grandes células B, forte sinal nuclear em menos de 50% das células neoplásicas; d) Caso 11-Linfoma difuso de grandes células B, forte sinal nuclear em célula isolada; e-f) imunohistoquímica pela técnica de avidina-biotina-fosfatase alcalina: e) Caso 3, Linfoma difuso de grandes células B expressão citoplasmática e membranar do antígeno latente de membrana (LMP) 1 do EBV; f) Caso 3, Linfoma difuso de grandes células B forte expressão nuclear do antígeno nuclear 2 do EBV (EBNA-2) (Aumentos 150x, 400X, 150X, 250X, 300X, 250X).

7. DISCUSSÃO

A partir de 1996, neoplasias malignas tais como sarcoma de Kaposi, carcinoma invasor de colo uterino e alguns tipos de linfoma passaram a ser consideradas condições definidoras de AIDS em pacientes HIV-positivos. Linfomas não Hodgkin de alto grau de malignidade fazem parte deste grupo e podem ser a primeira manifestação da doença. Desde que diferentes aspectos clínico-epidemiológicos e patológicos têm sido descritos em linfomas ocorrendo em pacientes HIV positivos (HIV+), a OMS (JAFFE, 2001) resolveu dedicar um capítulo à parte para os LNH neste grupo de pacientes. O uso desta classificação tem possibilitado observar diferenças geográficas quanto à ocorrência de linfomas não só em pacientes HIV-negativos quanto em pacientes HIV-positivos. O objetivo do nosso trabalho foi descrever os aspectos histológicos e clínicos dos LNH ocorrendo em pacientes HIV- positivos e negativos, e procedentes de uma mesma região geográfica em um mesmo período.

Obtivemos 17 casos de LNH associados ao HIV e 30 controles, diagnosticados em Salvador no período de 1998-2003. Quando comparamos este número com os dados do Ministério da Saúde (DADOS, 2002) que indicam a notificação de 1.276 casos de AIDS em Salvador no mesmo período, vemos que a proporção foi de cerca de 11 novos casos de LNH associado ao HIV para cada 1000 novos casos de AIDS notificados. Entretanto, estes dados não podem ser extrapolados para uma base populacional, visto que o nosso estudo não abrangeu, sistematicamente, todos os serviços onde se faz diagnóstico de LNH e a sorologia não foi realizada de rotina, em todos os casos de LNH diagnosticados no período.

Estudos em países desenvolvidos como EUA e Itália indicam que cerca de 8-10% dos LNH estão relacionados a AIDS (BIGGAR & RABIN, 1992; DAL MASO, et al., 2001). Se aplicarmos os dados destes estudos à nossa população, esperaríamos encontrar um número

maior de casos de LNH, em pacientes com AIDS, em nosso meio. No entanto, na análise de 230 prontuários no HUPES e HAM apenas oito casos de LNH estavam associados a AIDS, o que representa 3,4% do total de LNH avaliados em ambos os hospitais. No serviço da rede privada em que foi feita a avaliação de 49 prontuários de casos consecutivos de LNH, ocorrendo no mesmo período, encontramos quatro casos de LNH associados a AIDS. Isto representou 8,1% do total dos casos revisados. O reduzido número de casos de LNH relacionados ao HIV na rede pública, quando comparado ao número de casos da rede privada, deve-se, em parte, à ausência de sorologia para HIV nos prontuários, já que em apenas 13,5% dos prontuários a sorologia foi encontrada. Por outro lado, em 57,1% dos prontuários do serviço rede privada, a sorologia para HIV foi encontrada.

Um menor risco relativo de LNH em pacientes com AIDS foi descrito em países subdesenvolvidos como consequência de subdiagnósticos e morte precoce (CLARKE & GLASE, 2001). Comparando os nossos dados, no entanto, com estudos realizados na África (PARKIB, et.al., 1999; CHOKUNONGA, et al., 1999), observamos que temos um número maior de casos de LNH ocorrendo em pacientes com AIDS que no continente africano. A frequência elevada de outras complicações fatais nos pacientes com AIDS africanos e a possibilidade de um número maior de casos não diagnosticados, poderia ser responsável pelo menor número de LNH nos pacientes com AIDS na África. Outra explicação para este fato, seria uma melhor assistência médica no Brasil para os pacientes HIV-positivos determinando uma maior sobrevida (PIO MARINS, et al., 2002), permitindo maior tempo para o desenvolvimento de LNH no curso da doença.

De uma maneira geral, o LNH é considerado uma manifestação tardia da infecção pelo HIV (LEVINE, et al., 2001). Quanto ao intervalo entre o diagnóstico do LNH e a sorologia positiva para HIV ou diagnóstico de AIDS observamos que, a maioria dos pacientes na nossa

série tiveram diagnóstico de LNH após o diagnóstico de AIDS. Entretanto, em um número considerável de casos (41,1%) a sorologia positiva para HIV foi obtida após ou simultaneamente ao diagnóstico de LNH. A literatura já apontava, mesmo antes da introdução da HAART, para a possibilidade de LNH como primeira manifestação da AIDS (LEVINE, et al., 1993). Atualmente com a redução de diagnósticos de AIDS decorrentes de infecções oportunistas induzidas pelo uso da HAART, tem havido uma tendência a um aumento de novos diagnósticos de AIDS após o diagnóstico de LNH (MOCROFT, et al., 2000). Três casos da nossa série tiveram sorologia positiva para HIV/diagnóstico de AIDS após o de LNH com intervalo máximo de 5 meses. Levando-se em consideração o tempo de incubação do vírus e evolução natural da infecção (VERGIS & MELLORS, 2000), o HIV teria sido detectado antes do LNH, caso o paciente tivesse realizado a sorologia antes. Considerando as particularidades que existem no grupo de pacientes com LNH HIV+, incluindo prognóstico e tratamento distintos (LEVINE, et al, 2000), estes casos de HIV+/ AIDS simultâneos e ou posteriores ao diagnóstico de LNH descritos no nosso trabalho, salientam a importância de se solicitar sorologia para HIV, de rotina, nos pacientes com LNH.

Na maioria dos casos descritos neste trabalho o diagnóstico de HIV foi confirmado por *Western blot* conforme recomendação do CDC (INTERPRETATION, 1989). Em um caso, no entanto, o diagnóstico da AIDS foi obtido apenas por testes repetidos de ELISA, também considerado diagnóstico conclusivo da infecção pelo HIV (CARVALHO, et al., 1996). Quatro casos em que não foi encontrado nenhum teste laboratorial demonstrando o HIV na revisão de prontuário, foram incluídos no grupo de LNH em HIV+ baseados no fato de que, três possuíam registro no CREAIDS, centro de referência em acompanhamento ambulatorial de pacientes HIV+ em Salvador, e um tinha registro na farmácia do HUPES como paciente em uso de tratamento anti-retroviral anti-HIV.

A maioria dos casos estudados nesta série ocorreu em indivíduos do sexo masculino, à semelhança do que tem sido observado em outras séries de pacientes com LNH e AIDS fora do Brasil (LEVINE, et al., 2001) e no nosso país (BACCHI, et al., 1996). O mesmo foi visto para os pacientes controles, nos quais a maioria, também foi de homens. Este predomínio do sexo masculino é explicado tanto nos casos quanto nos controles, pelo fato de que, tanto o LNH (SWERDLOW, 2003) quanto a AIDS (UNAIDS, 2002; DADOS, 2002), são mais freqüentes em homens.

Dados de literatura apontam para um aumento de incidência de casos de LNH em jovens em áreas com alta incidência de AIDS (SWERDLOW, 2003). De acordo com estes dados, quando comparamos a faixa etária dos casos com a dos controles, vemos que os pacientes com LNH associados a AIDS foram significativamente mais jovens que os pacientes HIV-negativos ($p=0,01$). Considerando o diagnóstico de AIDS, observamos que a faixa etária encontrada no grupo de pacientes HIV-positivos neste estudo é semelhante a da população acometida por AIDS no Brasil (DADOS, 2002). Apesar de os dados de literatura demonstrarem um risco relativo de LNH de 1.203 (95% IC 688-1.949) em crianças infectadas pelo HIV (DAL MASO & FRANCECHI, 2003), não encontramos nenhum caso de LNH associado ao HIV nesta população, no período estudado, em Salvador. Não temos uma explicação clara para este fato, a não ser a informação que obtivemos nos serviços consultados de que a sorologia para HIV não constitui exame de rotina em todas as crianças com diagnóstico de LNH atendidas por estes.

Dados da literatura indicam uma tendência à apresentação extranodal nos LNH associados a AIDS (HAMILTON-DUTOIT, et.al.,1991; TIRELLI, et al., 2000). No nosso estudo, observamos que a maioria dos casos descritos, apresentava-se com doença extranodal ao diagnóstico. No entanto, discordando dos dados de literatura que indicam um predomínio de doença nodal em pacientes LNH HIV negativos (BESIEN & CARBANILLAS, 2000),

obtivemos um número elevado de pacientes com doença extranodal ao diagnóstico neste grupo. Embora não tenha sido observada diferença quanto à proporção global dos casos e controles com envolvimento extranodal, foi observada uma diferença significativa quando analisamos o tipo de acometimento extranodal, se primário ou secundário. O comprometimento extranodal primário ocorreu numa proporção significativamente maior de casos que nos controles ($p=0,004$). Nos casos de LNH em pacientes HIV-positivos descritos no Brasil por Bachi et. al. em 1996 a frequência do acometimento extranodal foi bem inferior (33%) a observada nos nossos casos. Nos controles, o sítio extranodal foi envolvido, na maioria dos casos, de forma secundária, refletindo uma doença disseminada ao diagnóstico. A escassez de resultados de sorologia para HIV nos prontuários, descrita anteriormente, limitou muito o número de controles HIV-negativos da rede pública incluídos no nosso estudo. Isto pode ter levado a um possível viés de seleção dos pacientes no grupo controle, incluindo maior número de pacientes que, por possuírem doença mais disseminada ao diagnóstico, inclusive com acometimento extranodal, teriam sido indicados preferencialmente para realização da sorologia para HIV, enquanto que outros com LNH em estado inicial não foi feita a sorologia.

Em ordem decrescente, os principais sítios de comprometimento extranodal entre os casos foram: estômago, cavidade oral, fígado e intestino. Estes dados se assemelham aos dados encontrados na literatura (LEVINE, 2000) porém, diferem dos descritos no Brasil por Bachi et al em 1996 em que a pele, mucosa oral, endométrio, ossos e sistema nervoso central foram os sítios de acometimento extranodais mais frequentemente acometidos. Encontramos na nossa série, poucos casos com infiltração de medula óssea. Além dos casos em que não foram encontrados exame de biópsia óssea no prontuário, observamos que os pacientes que possuíam este exame no estadiamento do LNH em geral, possuíam apenas laudo de uma única biópsia óssea. A realização de biópsia de medula óssea deve fazer parte dos exames de

estadiamento dos pacientes com LNH e a realização de exames múltiplos ao diagnóstico aumenta de 10-20% a possibilidade de se observar infiltração medular (CHESON, et al 1999). O SNC foi envolvido em apenas um caso, de forma secundária, ou seja, por disseminação. Não encontramos nenhum caso com envolvimento primário do SNC. Em nosso meio, SANTOS, R.A., em 2001, demonstrou a ocorrência de 6,4% de linfomas primários do SNC numa série de 62 casos consecutivos de AIDS necropsiados no período de 1991 a 1999. Desde que alguns destes só foram diagnosticados após o óbito, possivelmente poderíamos ter observado algum caso de comprometimento desta região caso fossem solicitados exames tomografia computadorizada/ressonância nuclear magnética de crânio e/ou estudo do líquido de rotina nos pacientes HIV+. Na revisão do prontuário encontramos descrição de pelo menos um destes exames em apenas em cinco casos (29,4%). Outra possibilidade é que, frente às manifestações neurológicas da AIDS, os sinais e sintomas do linfoma cerebral possam ter ficado obscurecidos. Porém, a revisão de 23 casos de necrópsias em pacientes com AIDS em nosso estudo, não demonstrou nenhum caso de LNH em SNC. Por outro lado, é importante ressaltar que, com o advento da HAART, tem sido observado uma redução nos LNH primários de SNC em pacientes com AIDS (INTERNATIONAL, 2000).

Tanto no grupo de casos quanto nos controles a maioria dos pacientes apresentou ao diagnóstico do LNH, estádios clínicos avançados (III - IV). Em relação aos pacientes HIV+, este dado está em concordância com a maioria dos estudos que mostram predominância de pacientes nos estádios clínicos mais avançados entre os pacientes com LNH associados a AIDS (LEVINE, 2000). Analisando os pacientes com estádios clínicos iniciais (I - II) no grupo de casos vemos que todos, exceto um paciente, possuíam LNH primário de estômago, indicando uma possível tendência para o diagnóstico mais precoce ou uma probabilidade de um comportamento clínico distinto nestes casos, com uma tendência a maior infiltração local e uma menor disseminação para outros sítios, haja visto a presença comum nestes casos

primários de estômago, de doença localizada, em geral, volumosa. Em relação aos pacientes do grupo controle, a presença de uma maioria de pacientes com estágios clínicos mais avançados, contrariou os dados de literatura que indicam uma proporção menor de diagnósticos em estágios III-IV nestes pacientes, do que o demonstrado nesta série (BESIEN, et al., 2000). Esta maioria de pacientes com doença disseminada neste grupo, superando até mesmo o percentual encontrados nos casos, pode ser devido ao atendimento, sobretudo na rede pública, de pacientes com doenças com maior tempo de instalação, decorrentes das condições sócio-econômicas e da dificuldade de acesso aos serviços e saúde no nosso país. Esta explicação é reforçada pelo fato de que todos os pacientes em estágios iniciais no grupo controle foram diagnosticados na rede privada de atendimento. Como referido anteriormente, também não podemos excluir a possibilidade de ter ocorrido um viés de seleção dos pacientes do grupo controle pela tendência à solicitação de sorologia para HIV nos pacientes com doença mais avançada. Uma outra explicação provável, seria haver um acompanhamento clínico mais rigoroso nos pacientes HIV+, que poderia estar levando ao diagnóstico de LNH mais precoce neste grupo.

Observamos que tanto pacientes no grupo de casos quanto nos controles de que foram obtidos os valores de LDH no diagnóstico do LNH, este valor encontrava-se normal em cerca de metade dos pacientes de cada grupo. Este dado obtido, em nosso estudo, contraria os dados de literatura, que apontam para o fato de que na maioria dos pacientes com LNH e AIDS, e, naqueles com estágios clínicos avançados de LNH em geral, esta enzima encontra-se elevada (CARBONE, 1997). Não temos nenhuma uma explicação clara para este fato, no entanto, ressaltamos que o número reduzido de pacientes em ambos os grupos, a falta deste dado em parte tanto dos casos quanto dos controles não nos permite conclusões sobre este dado.

Quanto ao valor de CD4 observamos que os pacientes com LNH e AIDS analisados apresentavam na sua maioria contagens de CD4 inferiores a 200 células/mm³. Este valor está de acordo com a literatura que descreve maior probabilidade do LNH ocorrer no contexto de imunossupressão severa, e contagens de CD4 abaixo de 200/mm³ (LEVINE, et al., 2001). Valores de CD4, acima ou abaixo de 200/mm³ tem sido relacionados a diferentes subtipos de linfomas (CARBONE, 1987), entretanto em nosso estudo não foi possível verificar tal correlação.

A maioria dos paciente no grupo de casos apresentavam segundo a classificação da OMS-01, subtipos histológicos de LNH comuns a indivíduos imunocompetentes. O subtipo mais comum foi o LDGC e o segundo tipo histológico mais encontrado foi o LB. Nos casos relatados previamente em nosso país por BACCHI, et al., em 1996, a proporção destes subtipos histológicos foi semelhante ao observado na nossa série, com 55% de LDGC e 25% de LB. Apesar de historicamente o LB ter sido o primeiro tipo histológico descrito em pacientes com AIDS (DOLL & LIST, 1982), estudos epidemiológicos subsequentes demonstraram que o LDGC é o mais freqüente (BERAL, et al., 1991). Se classificados pela *Working Formulation* todos os nossos casos de pacientes HIV+ com LNH seriam enquadrados como linfomas de grandes células, de alto grau de malignidade. Apesar de menos freqüentes, os LNH de células T, também são encontrados nos pacientes HIV+ em várias séries (BEYLOT-BARRY, et al., 1999; CANIONI, et al., 2000; GOLD, et al., 1990; RUFF, et al., 1989; BIGGAR, et al., 2001), no entanto, não observamos nenhum caso de LNH com imunofenótipo T nos nossos casos. Na população estudada por BACCHI, et al. em 1996, no Brasil, apesar da maioria dos casos (90%) ter sido de LNH de células B havia um caso de LNH de células T e outro com fenótipo nulo. Considerando a menor freqüência de fenótipos T em relação aos B em associação com AIDS e o pequeno número de casos, este predomínio exclusivo de LNH com fenótipo B no nosso meio não necessariamente se

maneira, caso a nossa série fosse maior. No grupo controle do nosso estudo, ocorreu uma maior diversidade nos LNH, tanto de subtipos histológicos quanto de fenótipos. Se classificados pela *Working Formulation* os pacientes do grupo HIV-negativos, seriam enquadrados em diversos graus de malignidade: aqueles de baixo grau ou seja de comportamento clínico indolente, os de grau intermediários e menos freqüentemente os de alto grau de malignidade, com comportamento clínico agressivo. Esta diferença entre subtipos histológicos, graus de malignidade e fenótipos mostra uma tendência a uma maior diversidade nos pacientes com LNH HIV- em comparação com uma maior homogeneidade nos HIV+. Isto pode estar relacionado aos fatores que determinam linfomagenese nos diferentes grupos, possivelmente mais específicos e diretos no grupo HIV positivo.

A pesquisa para EBV por técnica de hibridização *in situ* no grupo HIV-positivo revelou presença deste vírus no tecido tumoral da maioria dos casos (70,5%) e na minoria (21,4%) dos controles ($p = 0,002$, OR 8,8; IC (95%): 2,215 - 34,965). Quando comparamos estes dados com o que encontramos na literatura verificamos que a positividade para EBER por hibridização *in situ* nos LNH em pacientes HIV+ de 70,5% dos casos estudados, foi maior do que o descrito na classificação da OMS-2001, de aproximadamente 60% em geral (JAFFE, et al.,2001). Alguns dos trabalhos que utilizaram a mesma técnica para avaliar a presença de EBV em LNH sistêmicos em pacientes com AIDS, também encontraram um número menor de casos positivos para EBV. GOEDERT em 2000, nos EUA, encontrou 40% de positividade; CARBONE, 1994, na Itália, encontrou 50%; HAMILTON-DUTOIT, 1993 na Dinamarca, demonstrou 58% de positividade. O trabalho de BACCHI et al., 1996 realizado com pacientes diagnosticados em São Paulo e em Salvador mostrou 55% de positividade para EBV. No entanto, foram utilizadas sondas de oligonucleotídeos ao invés de sondas de RNA e isto pode ter influenciado nesta diferença. Quando separamos percentual de casos positivos para EBV por subtipo histológico, observamos a mesma tendência, ou seja, uma maior

proporção de casos positivos para EBER por subtipo que o descrito na literatura (JAFFE, et al., 2001; GEBARRE, et al., 2001; CARBONE, 2002). Também em relação ao número de células infectadas, os casos exibiram maior número de células EBER-positivas quando comparado com os controles. Esta diferença não atingiu significância estatística, devido provavelmente ao pequeno número de controles positivos para EBER. Em pacientes HIV-positivos há redução da resposta T citotóxica específica para EBV e um conseqüente aumento da carga viral do EBV (BIRX, 1986). Adicionalmente, o EBV em um meio imunossupressor passa a expressar proteínas capazes de induzir a transformação e imortalização de células linfóides (CHOEN J.I., et al 2000). Portanto, diante do seu potencial oncogênico, este vírus pode ter um papel importante na linfomagênese em pacientes imunossuprimidos.

Estudos em pacientes com LNH imunocompetentes, que utilizaram a mesma metodologia para pesquisa de EBER que o nosso (HUMMEL et al, 1995, TERAMOTO, et al.,1996), mostraram um percentual ligeiramente maior (25%) de casos positivos que o encontrado no nosso grupo controle (21%). Como os LNH de células T demonstram uma maior positividade para o EBER que os de células B (TERAMOTO, et al 1996, YOUNG-HYEH, et al., 1994; D'AMORE, et al., 1996) e relatamos neste grupo apenas dois LNH de células T submetidos à pesquisa de EBER, um dos quais positivos, esta pode ser uma possível explicação para esta diferença. Outra explicação seria o número de LNH nestas séries que foi 5 a 10 vezes maior que o número aqui descrito e que esta pequena diferença, portanto não seja considerável. Da mesma forma que em pacientes imunossuprimidos, o EBV está associado a determinados subtipos histológicos e principalmente linfomas de alto grau de malignidade (Jaffe et al., 2001, HUMMEL et al., 1995). Compatível com este dado da literatura, os linfomas do nosso grupo controle associados ao EBV eram B ou T de alto grau de malignidade. Uma maior incidência da associação do EBV com linfomas em pacientes imunocompetentes no grupo pediátrico (25%) foi descrita recentemente na Argentina (CHABAY, et al. 2002). Embora

não tenhamos no nosso material nenhum linfoma pediátrico, estudo no nosso meio demonstrou um alto índice de positividade para EBV (87%) em casos de LB de crianças em Salvador (ARAUJO et al, 1996). Tal dado pode indicar a probabilidade de uma forte associação do LNH, em certos grupos de pacientes com LNH, na nossa cidade, com o EBV. O número de casos de LNH em AIDS que descrevemos, no entanto, é reduzido para que se possa retirar qualquer conclusão definitiva.

Todos os casos submetidos a imunoistoquímica para os antígenos LMP-1 e EBNA-2 do EBV, tendo em vista a maior sensibilidade da técnica, foram também positivos para EBER na hibridização in situ (GULLEY, 2001). Quanto ao padrão de latência viral verificamos nos pacientes HIV-positivos a presença de todos os três padrões, em concordância com os vários estudos neste tipo de paciente (TERAMOTO, et al., 1996; HAMILTON-DUTOIT, et al., 1993). No grupo controle, demonstramos também a presença de todos os três padrões de latência, contrariando os dados de literatura que descrevem a latência viral tipo III exclusivamente nos LNH ocorrendo no contexto de imunodeficiência (NIEDOBITEK & YOUNG, 1997). Na revisão do prontuário do paciente com latência viral tipo III do grupo controle, observamos escassez de dados e por isto, não podemos descartar, a existência de algum outro tipo de imunodeficiência ou mesmo a possibilidade de falso negativo no exame de sorologia para HIV.

A clonalidade da infecção pelo EBV nos LNH relacionados ao vírus HIV (KAYE, et al., 1993; HAMILTON-DUTOIT, et al., 1991), tem sugerido que a infecção pelo EBV, precede a transformação maligna, reforçando a importância deste vírus na patogênese do LNH na AIDS. A maior positividade para antígenos de latência viral do EBV, relacionados à imortalização celular, nos casos do que nos controles, observada em nosso estudo, apontam para o papel deste vírus na gênese dos LNH em AIDS. As observações indicam que o EBV

funciona como agente facilitador, induzindo através da expressão de LMP-1 e EBNA-2 a imortalidade de linfócitos em pacientes imunossuprimidos. Esta imortalização contribuiria para a sobrevivência de linfócitos e conseqüente acúmulo de mutações em linfócitos infectados que poderia determinar a geração de um clone maligno. Entretanto, o papel do EBV ainda é controverso e outros fatores certamente estão envolvidos na linfomagênese, já que a infecção pelo EBV esta presente em apenas parte dos linfomas nos pacientes HIV+. O estudo aprofundado do curso da infecção pelo EBV em pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos, do papel da reativação da infecção pelo EBV, bem como de outros possíveis fatores envolvidos na gênese dos LNH poderá, portanto, representar um avanço na nossa compreensão da patogênese dos linfomas.

8. CONCLUSÕES

1. Observamos uma menor frequência de LNH adultos e pediátricos associados a AIDS em Salvador, no período de janeiro de 1998 a fevereiro de 2003, em relação à maioria dos estudos em países ocidentais. Desde que este achado está provavelmente relacionado à não realização sistemática de investigação para HIV em linfomas no nosso meio, o estudo aponta a necessidade da solicitação rotineira da sorologia para HIV nos pacientes com LNH.
2. Os pacientes com diagnóstico de LNH e sorologia positiva para HIV foram significativamente mais jovens que aqueles com diagnóstico inicial de LNH e sorologia negativa para HIV
3. A maioria dos pacientes com LNH e sorologia positiva para HIV apresentava doença extranodal primária, enquanto que os pacientes HIV-negativos apresentavam doença extranodal secundária à disseminação neoplásica.
4. Foi observada uma tendência para o diagnóstico mais precoce do LNH primário de estômago em pacientes HIV positivos em nosso meio.
5. Os LNH em pacientes HIV-positivos foram de células B de alto grau de malignidade, enquanto os pacientes HIV-negativos apresentaram fenótipos B, T, nulo e diversos graus de malignidade.
6. Os subtipos histológicos em pacientes HIV-positivos foram LDGCB, linfoma de Burkitt e linfoma plasmoblástico enquanto os pacientes HIV-negativos exibiram uma grande variedade de subtipos histológicos.
7. A alta prevalência da infecção pelo EBV no tecido tumoral na maioria dos casos quando comparados aos controles ($p=0,001$), sugere um possível papel patogênico deste vírus na etiologia dos LNH em pacientes imunossuprimidos em nosso meio.

8. O encontro de latência viral tipo III em paciente HIV-negativo, descrito na literatura como restrito a pacientes imunossuprimidos, aponta a possibilidade de outros fatores causadores de imunossupressão, presentes nos pacientes com LNH no nosso meio.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, S.D.; ROWE, M.; CADWALLADER, K.; RICKSTEN, A.; GORDON, J.; WANG, F.; RYMO, L.; RICKINSON, A.B. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. **J. Virol.**, **64**:2126-2134, 1990.
- AL SHAHI, R.; BOWER, M.; NELSON, M.R.; GAZZARD, B.G. Cerebrospinal fluid Epstein-Barr virus detection preceding HIV-associated primary central nervous system lymphoma by 17 months. **J. Neurol.**, **247**:471-472, 2000.
- AMBINDER, R.F. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferations in AIDS setting. **Eur. J. Cancer**, **37**:1209-1216, 2001.
- ARAÚJO, I.; FOSS, H.D.; HUMMEL, M.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; BARBOSA, H.S.; BITTENCOURT, A.; STEIN, H. Frequent expansion of Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in germinal centres of tonsils from an area with a high incidence of EBV-associated lymphoma. **J Pathol.** **187**:326-330, 1999
- BACCHI, C.E.; BACCHI, M.; RABENHORST, S.H.; SOARES, F.A.; FONSECA JR, L.E.; BARBOSA, H.S.; WEISS, L.W.; GOWN, A.M. AIDS-related lymphoma in Brazil. Histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus. **Hematopathology**, **105**:230-237, 1996.
- BALLERINI, P.; GAIDANO, G.; GONG, J.Z.; TASSI, V.; SAGLIO, G.; KNOWLES, D.M.; DALLA-FAVERA, R. Multiple genetic lesions in acquired immune deficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, **81**:166-176, 1993.
- BEATY, M.W.; KUMAR, S.; SORBARA, L.; MILLER, K.; RAFFELD, M.; JAFFE, E.S. A biphenotypic human herpesvirus 8-associated primary bowel lymphoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, **23**:992-994, 1999.

BERAL, V.; PETERMAN, T.; BERKELMAN, R.; JAFFE, H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**, **337**:805-809, 1991.

BESIEN, K.V. & CARBANILLAS, F. Clinical manifestations, staging and treatment of non-Hodgkin's Lymphoma. In: HOFFMAN, R.; BENZ, J.E.; SHATTIL, S.D.; FURIE, B.; COHEN, H.J.; SILBERSTEIN, L.E.; Ma GLAVE, P. (Ed.). **Hematology Basic Principles and Practice**. 3. ed. Churchill Livingstone, 2000. p 1293-1339.

BEYLOT-BARRY, M.; VERGIER, B.; MASQUELIER, B.; BAGOT, M.; JOLY, P.; SOUTEYRAND, P.; VAILLANT, L.; AVRIL, M.F.; FRANCK, N.; FRAITAG, S.; DELAUNAY, M.; LAROCHE, L.; ESTEVE, E.; COURVILLE, P.; DECHELOTTE, P.; BEYLOT, C.; DE MASCAREL, A.; WECHLER, J.; MERLIO, J.P. The spectrum of cutaneous lymphomas in HIV infection: a study of 21 cases. **Am. J. Surg. Pathol.**, **23**:1208-1216, 1999.

BIGGAR, R.J.; ENGELS, E.A.; FRISCH, M.; GOEDERT, J.J. Risk of T cell lymphomas in persons with AIDS. **J. Acquir. Immune Defic. Ssyndr. Hum. Retrovirol.**, **26**:371-376, 2001.

BIGGAR, R.J.; RABKIN, C.S. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas. **Curr. Opin. Oncol.**, **4**:883-892, 1992.

BIRX, D.L.; REDFIELD, R.R.; TOSATO, G. Defective regulation of Epstein-Barr virus infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or AIDS-related disorders. **New. Engl. J. Med.**, **314**:874-878, 1986.

BOENISH, T. **Imunochemical staining methods**. USA: Dako Corporation, 1989.

BOWER, M. Acquired immune deficiency syndrome-related systemic non-Hodgkin's lymphoma (Review) . **Br. J. Haematol.**, **112**:863-873, 2001.

BRYNES, R.K.; WING C. CHAN, M.B.; SPIRA, T.J.; EWING, E.P.; FRANCIS, W.; CHANDLER, D.V.M. Value of lymph node biopsy in unexplained lymphadenopathy in homosexual men. **JAMA**, **250**:1313-1316, 1983.

BYLUND, D. J.; ZIEGNER, U.H.; HOOPER, D. G. Review of testing for immunodeficiency virus . **Clin. Lab. Med.**, **12**:305-333, 1992.

CAMILLERI-BROËT, S.; DAVI,F.; FEULLARD, J.; SEILHEAN, D.; MICHIELS, J.F.; BROUSSET, P.; EPARDEAU, B.; NAVRATIL, E.; MOKHTARI, K.; BOURGEOIS, C.; MARELLE, L.; RAPHAËL, M.; HAUW, J.-J.; AND FRENCH STUDY GROUP FOR HIV-ASSOCIATED TUMORS. AIDS –related primary brain lymphomas: histopathologic and immunohistochemical study of 51 cases. **Hum. Pathol.**, **28**:367-374, 1997.

CANIONI, D.; ARNULF, B.; ASSO-BONNET, M.; RAPHAEL, M.; BROUSSE, N. Nasal natural killer lymphoma associated with Epstein-Barr virus in a patient infected with human immunodeficiency virus infection. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **125**:660-662, 2001.

CARBONE, A. The spectrum of AIDS-related lymphoproliferative disorders. **Adv. Clin. Pathol.**, **1**:13-19, 1997.

CARBONE, A. AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. From pathology and molecular pathogenesis to treatment. **Hum. Pathol.**, **33**:392-404, 2002.

CARBONE, A. Emerging pathways in the development of AIDS-related lymphomas. **Lancet Oncol.**, **4**:22-29, 2003.

CARBONE, A.; GLOGHINI, A.; VOLPE, R.; BOIOCCHI, M.; TIRELLI, U. Italian Cooperative Group on AIDS Tumors. High frequency of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 expression in acquired immunodeficiency syndrome-related Ki-1(CD30)-positive anaplastic large cell lymphomas. **Am. J. Pathol.**, **101**:768-772, 1994.

CARBONE, A.; PASTORE,C.; GAIDANO, G.; GIOGHINI, A.; PASTORE, C.; SAGLIO, G.; TIRELLI, U.; DALLA-FAVERA, R.; FALINI, B. BCL-6 protein expression in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. Inverse relationship with Epstein-Barr-encoded latent membrane protein-1 expression. **Am. J. Pathol.**, **150**:155-165, 1997.

CARBONE, A.; TIRELLI, U.; GLOGHINI, A.; VOLPE, R.; BOIOCCHI, M. Human immunodeficiency virus-associated systemic lymphomas may be subdivided into two main

groups according to Epstein-Barr virus-latent gene expression. **J. Clin. Oncol.**, **11**:1674-1681, 1993.

CARMICHAEL, A.; JIN, X.; SISSONS, P.; BORYSIEWICZ, L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: Differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. **J. Exp. Med.**, **177**:249-256, 1993 .

CARVALHO, M.B.; HAMERSCHLAK, N.; VAZ, R.S.; FERREIRA JUNIOR, O. C. Risk factors analysis and serological diagnosis of HIV-1/HIV-2 infection in a Brazilian blood donor population: Validation of the World Health Organization strategy for HIV testing. **AIDS**, **10**:1135-1140, 1996.

CDC-Center of Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR-Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, **41**:1-19, 1992.

CESARMAN, E.; KNOWLES, D.M. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases. **Semin. Cancer Biol.**, **9**:165-174, 1999.

CESARMAN, E.; CHANG, Y.; MOORE, P.S.; SAID, J.W.; KNOWLES, D.M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. **N. Engl. J. Med.**, **332**:1186-1191, 1995.

CHABAY, P.A.; DE MATTEO, E.N.; AVERSA, L.; MAGLIO, S.; GRINSTEIN, S.; PRECIADO, M.V. Assesment os Epstein-Barr virus association with pediatric non-Hodkin lymphoma in immunocompetent and immunocompromised patients in Argentina. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **126**:331-335, 2002.

CHADBURN, A.; CESARMAN, E.; JAGIRDAR, J.; SUBAR, M.; MIR, R.N.; KNOWLES, D.M. CD30 (Ki-1) positive anaplastic large cell lymphomas in individuals infected with the human immunodeficiency virus. **Cancer**, **72**:3078-3090, 1993.

CHAISSON R.E.; STERLING, T.R.; GALLANT, J.E. General clinical manifestations of human immunodeficiency virus infection (including oral, cutaneous, renal, ocular and cardiac diseases). In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 5 th. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. v.1, cap. 108, p. 1398-1414.

CHESON, B.D.; HORNING, S.J.; COIFFER, B.; SHIPP, M.A.; R.I.; FISHER, R.I; CONNORS, J.M.; LISTER, A.T.; VOSE, J.; GRILLO-LÓPEZ, A.; HANGEBEEK, A.; CABANILLAS, F.; KLIPPENSTEN, D.; HIDDEMANN, W.; CASTELLINO, R.; HARRIS, N.L.; ARMITAGE, J.O.; CARTER, W.; HOPPE, R.; CANELLOS, G.P. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. **J. Clin. Oncol.**, **17**:1244-1253, 1999

CHOKUNONGA, E.; LEVY, L.M.; BASSETT, M.T.; BOROK, M.Z.; MAUCHAZA, B.G.; CHIRENJE, M.Z.; MAXWELL, P.D. Aids and cancer in Africa: the evolving epidemic in Zimbabwe. **AIDS**, **13**:2583-2588, 1999.

CLARK, D.R.; DE BOER, R.J.; WOLTHERS, C.; MIEDEMA, F. T-cell dynamics in HIV-1 infection. **Adv. Immunol**, **73**:301-327, 1999.

CLARKE, C.A. & GLASER, S.L. Epidemiologic trends in HIV-associated lymphomas. **Curr. Opin. Oncol.**, **13**:354-359, 2001.

CLAVEL, F.; GUÉTARD, D.; BRUN-VÉZINET, F.; CHAMARET, S.; REY, MA.; SANTOS-FERREIRA, M.O.; LAURENT, A. G.; DAUGUET, C.; KATLAMA, C.; ROUZIQUX, C.; KLATZMANN, D.; CHAMPALIMAUD, J. L.; MONTAGNIER, L. Isolation of a new human retrovirus from west african patients with AIDS. **Science**, **233**:343-346, 1986.

CLERICI, M. & SHEARER, G.M. A Th1 to Th2 switch is a critical step in etiology of HIV infection. **Immunol. Today**, **107**:107-111, 1999.

COHEN, J.I. Epstein-Barr virus infection. **N. Engl. J. Med.**, **343**:481-492, 2000.

COHEN, J.I.; WANG, F.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. **J. Virol.**, **65**:2545-2554, 1991.

COHEN, O.; CICALA, C.; VACCAREZZA, M.; FAUCCI, A.S. The immunology of human immunodeficiency virus infectio. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Ed.). **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 5 th. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. v.1, cap. 107, p. 1374-1397.

COHEN, O; WEISSMAN, D.; FAUCI, A.S. Immunopathogenesis of HIV infection. In: **Fundamental Immunology**. WILLIAM, E.P. (Ed.). 4.th. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 1455-1509

CURRAN, J.W.; LAWRENCE, D.N.; JAFFE, H.; KAPLAN, J.E.; ZYLA, L.D.; CHAMBERLAND, M.; WEINSTEIN, R.; LUI, K-J.; SCHONBERGER, L.B.; SPIRÁ, T.J.; ALEXANDER, W.J.; SWINGER, G.; AMMANN, A.; SOLOMON, S.; AUERBACH, D.; MILDVAN, D.; STONEBURNER, R.; JASON, J.M.; HAVERKOS, H.W.; EVATT, B.L. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusion. **N. Engl. J. Med.**, **310**:69-75, 1984.

D' AMORE, F.; JOHANSEN, P.; HOUMAND, A.; WEISENBURGER, D.D.; MORTENSEN, L.S.; for the Danish Lymphoma Study Group, LYFO. Epstein-Barr virus genome in non-hodgkin's lymphomas occurring in immunocompetent patients: highest prevalence in nonlymphoblastic T-cell lymphoma and correlation with a poor prognosis. **Blood**, **87**:1045-1055, 1996.

DADOS epidemiológicos – Brasil. Coordenação Nacional de DST e AIDS. **AIDS-Bol. Epidemiol.**, **16**:24-44, 2002.

DAL MASO, L.; FRANCESCHI, S. Epidemiology of non-Hodgkin lymphomas and other haematolymphopoietic neoplasms in people with AIDS. **Lancet Oncol.**, **4**:110-119, 2003.

DAL MASO, L; REZZA, G. ; ZAMBON, P.; TAGLIABUE, G.; CROCETTI, E.; VERCELLI, M. ; ZANETTI, R; FALCINI, F.; TONINI, G.; MANGONE, L.; DE LISI, V.;

FERRETTI, S.; TUMINO, R.; STANTA, G.; VITARELLI, S.; SERRANO D.;
FRANCESCHI S. for the Cancer and AIDS Registry Linkage Study. Non-Hodgkin
lymphoma among young adults with and without AIDS in Italy. **Int. J. Cancer**, **93**:230-435,
2001.

DAL MASO, L.; SERRRANO, D.; FRANCESCHI, S. Epidemiology of AIDS-related
tumours in developed and developing countries. **Eur. J. Cancer**, **37**:1188-1201, 2001.

DAVI, F.; DELECLUSE, H.J.; GUIET, P.; GABARRE, J.; FAYON, A.; GENTILHOMME,
O.; FELMAN, P.; BAYLE, C.; BERGER, F.; AUDOUIN, J.; BRYON, P.A. ; DIEBOLD, J. ;
RAPHAEL, M. Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: caracterization within a series of
103 human immunodeficiency virus-associated non- Hodgkin's lymphomas. (Burkitt's
Lymphoma Study Group). **J. Clin. Oncol.**, **16**:3788-3795, 1998.

DE MILITO A. B lymphocyte disfunctions in HIV infection. **Curr. HIV Res.**, **2(1)**: 11-
21,2004

DELECLUSE, H.J.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; DALLENBACH, F.; HUMMEL, M.;
MARAFIOTI, T.; SCHNEIDER, U.; HUHN, D.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.;
REICHART, P.A.; GROSS, U.; STEIN, H. Plasmablastic lymphomas of the human
immunodeficiency virus infection. **Blood**, **89**:1413-1420, 1997.

DELECLUSE, H.J.& HAMMERSSCHMIDT, W. The genetic approach to Epstein- Barr
virus: from basic virology to gene therapy. **Mol. Pathol.**, **53**:270-279, 2000.

DENG, H.; LIU, R.; ELLMEIER, W.; CHOE, S.; UNUTMAZ, D.; BURKHART, M.; DI
MARZIO, P.; MARMON, S; SUTTON, R.E.; HILL, C.M.; DAVIS, C.B.; PEIPER, S.C.;
SCHALL, T.J.; LITTMAN, D.R.; LANDAU, N.R. Identification of major co-receptor for
primary isolates of HIV -1. **Nature**, **381**:661-666, 1996.

DISTRIBUIÇÃO das doenças associadas, sinais e sintomas, no momento da notificação dos
casos de AIDS entre indivíduos com 13 anos de idade ou mais, por período de diagnóstico.
Brasil, 1983-2000. Tabela. Coordenação Nacional de DST e AIDS. **AIDS-Bol. Epidemiol.**,
13:48, 1999/2000.

DOLL, D.C.& LIST, A.F. Burkitt's lymphoma in homosexual. **Lancet**, **1**:1026-1027, 1982.

DOUGLAS, G.C.; KING, B.F. Maternal – fetal transmission of human immunodeficiency virus: A review of possible routes and cellular mechanisms of infection. **Clin. Infect. Dis.**, **15**:678-691, 1992.

DRENO, B.; MILPIED-HOMSI, B.; MOREAU, P.; BUREAU, B.; LITOUX, P. Cutaneous anaplastic T-cell lymphoma in patient with human immunodeficiency virus infection: detection of Epstein-Barr virus DNA. **Br. J. Dermatol.**, **129**:77-81, 1993.

ELBIM, C.; PREVOT, M.H.; BOUSCARAT, F.; FRANZINI, E.; CHOLLET-MARTIN, S.; HAKIM, J.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Impairment of polymorphonuclear neutrophil function in HIV-infected patients. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, **25**:S66-S70, 1995. Supplemento 2.

ELIOPOULOS, A.G.; STACK, M.; DAWSON, C.W.; KAYE, K.M.; HOGKIN, L.; SILHOTA, S.; ROWE, M.; YOUNG, L.S. Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via a NF kappa β pathway involving TNF receptor-associated factors. **Oncogene**, **14**:2899-2916, 1997.

ENGELS, E.A.; FRISCH, M.; LUBIN, J.; GAIL, M.; BIGGAR, R.J.; GOEDERT, J.J. Prevalence of hepatitis C virus infection and risk for hepatocellular carcinoma and non-Hodgkin lymphoma in AIDS. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **31**:536-541, 2002.

EVISON, J.; JOST, J.; LEDERGERBER, B.; JOST, L.; STRASSER, F.; WEBER, R. HIV-associated non-Hodgkin's lymphomas: highly active anti-retroviral therapy improves remission rate of chemotherapy. **AIDS**, **13**:732-734, 1999.

FASSONE, L.; CINGOLANI, A.; MARTINI, M.; MIGLIARETTI, G.; ORESTE, L. P.; CAPELLO, D.; GLOGHINI, A.; VIVENZA, D.; DOLCETTI, R.; CARBONE, A.; ANTINORI, A.; GAIDANO, G.; LAROCCA, M.L. Characterization of Epstein-Barr virus

genotype in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **18**: 19-26, 2002.

FAUCI, A. Host factors and pathogenesis of HIV-1 induced disease. **Nature**, **384**:529-534, 1996.

FENG, Y.; BRODER, C.C.; KENNEDY, P.E.; BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, **272**: 872-877, 1996.

FINE, H.A.; MAYER, R.J. Primary central nervous system lymphoma. (Review). **Ann. Inter. Med.**, **119**:1093-1104, 1993.

FONSECA JUNIOR, L.E. **Alterações Hepáticas em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida: avaliação histopatológica e ultra-estrutural: estudo através de biópsias hepáticas.** 163 f. 1998. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

FRISCH, M.; BIGGAR, R.J.; ENGELS, E.A.; GOEDERT, J.J., for the AIDS-Cancer Match Registry Study Group. Association of cancer with AIDS-related immunosupresion in adults. **JAMA**, **285**:1736-1745, 2001.

FRUEHLING, S.; LEE, S.K.; HERROLD, R. FRECH, B.; LAUX, G.; KREMMER, E.; GRASSER, F.A.; LONGNECKER, R. Identification of latent membrane protein 2 A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. **J. Virol.**, **70**:6216-6226, 1996.

GADELHA, S.R. **Epidemiologia molecular do HIV-1 no estado do Ceará, Brasil.** 2002. 107 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

GAIDANO, G.; CAPELLO, D.; CARBONE, A. The molecular basis of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomagenesis. **Sem. Oncol.**, **27**:431-441, 2000.

GAIDANO, G.; CARBONE, A.; DALLA-FAVERA, R. Pathogenesis of AIDS-related lymphomas. Molecular and histogenetic heterogeneity. **Am. J. Pathol.**, **152**:623-630, 1998.

GAIDANO, G.; DALLA-FAVERA, R. Protooncogenes and tumor supressor genes. In: KNOWLES, D.M. (Ed.). **Neoplastic Hematopathology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992. p. 245-262.

GAIDANO, G.; VIVENZA, D.; FORCONI, F.; CAPELLO, D.; GLOGHINI, A.; SAGLIO, G.; CARBONE, A.; DALLA-FAVERA, R. Involvement of the bcl-6 gene in AIDS-related lymphomas. **Ann. Oncol.**, **8**:S105-S108, 1997.

GAIL, M.H.; PLUDA, J.M.; RABKIN, C.S.; BIGGAR, R.J.; GOEDERT, J.J.; HORM, J.W.; SONDIK, E.J.; YARCHOAN, R.; BRODER, S. Projections of the incidence of non-Hodgkin's lymphoma related to acquired immunodeficiency syndrome. **J. Nat. Cancer Inst.**, **83**:695-701, 1991.

GALLO, R.C.; SALAUDDIN, S.Z.; POPOVIC, M.; SHEARER, G.M.; KAPLA, M.; HAYNES, B.F.; PALKER, T.J.; REDFIELD, R.; OLESKE, J.; SAFAI, B.; WHITE, G.; FOSTER, P.; MARKHAM, P.D. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. **Science**, **224**:500-503, 1984.

GALVÃO-CASTRO, B.; COUTO-FERNANDEZ, J.C.; MELLO, M.A.; LINHARES-DE-CARVALHO, M.I.; CASTELLO-BRANCO, L.R.; BONGERTZ, V.; FERREIRA, P.C.; MORGADO, M.; SABINO, E.; TANURI, A. A nationwide effort to sistematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. Brazilian Network for HIV-1 Isolation and Characterization. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **91**: 335-338, 1996.

GEBARRE, J.; RAPHAEL, M.; LEPAGE, E.; MARTIN, A. ; OKSENHENDLER, E. ; XERRI, L.; TULLIEZ, M.; AUDOUIN, M.; COSTELLO, R.; GOLFIER, J.B.; SCHLAIFER, D.; HEQUET, O.; AZAR, N.; KATLAMA, C.; GISSELBRECHT, C.; for the Groupe d'Etude des Lymphomes de l' Adulte (GELA). Humman immunodeficiency virus-related lymphoma: relation between clinical features and histologic subtypes. **Am. J. Med.**, **111**:704-711, 2001.

GIRES, O.; KOHLHUBER, F.; KILGER, E.; BRAUMANN, M.; KIESER, A.; ZEIDLER, R.; SCHEFFER, B.; UEFFING, M.; HAMMERSCHMIDT, W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. **EMBO Journal**, **18**: 3064-3073, 1999.

GOEDERT, J.J. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies. **Semin. Oncol**, **27**:390-401, 2000.

GOEDERT, J.J.; COTÉ, T.R.; VIRGO, P.; SCOPPA, S.M.; KINGMA, D.W. ; GAIL, M.H. ; JAFFE, E.S. ; BIGGAR, R.J. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. **Lancet**, **351**:1833-1839, 1998.

GOLD, J.E.; GHALI, V.; GOLS, S.; BROWN, J.C.; ZALUSKY, R. Angiocentric immunoproliferative lesion/ T-cell non-Hodgkin's lymphoma and acquired immunodeficiency syndrome: a case report and review of the literature. **Cancer**, **66**:2407-2413, 1990.

GREENE, W.C. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. **N. Engl. J. Med.**, **324**:308-317, 1991.

GOTTLIEB, M.S.; SCHROFF, R.; SCHANKER, H.M.; WEISMAN, J.D., FAN, P.T., WOLF, R.A.; SAXON, A. Pneumocystis carinii and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N. Engl. J. Med.**, **305**(24): 1425-1431, 1981.

GRULICH, A.E.; WAN, X.; LAW, M.G.; COATES, M.; KALDOR, J.M. Risk of cancer in people with AIDS. **AIDS**, **13**:839-843, 1999.

GUITART, J. HIV-1 and an HTLV-II-associated cutaneous T-cell lymphoma. **N. Engl. J. Med.**, **342**:930-936, 2000.

GULLEY, M.L. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. **J. Mol. Diag.**, **3**:1-10, 2001.

GULZAR, N.& COPELAND, K.F. CD8+ T-cells: function and response to HIV infection. **Curr. HIV Res.**, **2**(1): 23-37,2004.

GÜRTLER, L. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. **Lancet**, **348**:1761-1779, 1996.

HAMILTON-DUTOIT, S.T.; PALESEN, G.; KARKOV, J.; SKINHØJ, P.; FRANZMANN, M.B.; PEDERSEN, C. Identification of EBV-DNA in tumor cells of AIDS-related lymphomas by in situ-hybridization, **Lancet**, **2**:554-555, 1989.

HAMILTON-DUTOIT, S.J.; PALLESEN, G.; FRANZMANN, M.B.; KARKOV, J.; BLAVK, F.; PEDERSEN, C. AIDS-related lymphoma histopathology, immunophenotype and association with Epstein-Barr Virus as demonstrated by in situ nucleic acid hybridization. **Am. J. Pathol.**, **138**:149-161, 1991.

HAMILTON-DUTOIT, S.J.; RAFHAEL, M.; AUDOUIN, J.; DIEBOLD, J.; LISSE, I.; PEDERSEN, C.; OKSENHENDLER, E.; MARELLE, L.; PALLESEN, G. In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. **Blood**, **82**: 619-624, 1993.

HAMILTON-DUTOIT, S.J.; DELPHINE, R.; RAPHAEL, M.; SANDVEJ, K.; DELECLUSE, H.J.; GISSELBRECHT, C.; MARELLE, L.; JOHAN, H.J.M. van KRIEKEN; PALLESEN, G. Epstein-Barr virus-latent gene expression and tumor cell phenotype in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. Correlation of lymphoma phenotype with three distinct patterns of viral latency. **Am. J. Pathol.**, **143**:1072-1085, 1993

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; STEIN, H.; BANKS, P.M.; CHAN J.K.; CLEARY M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER KC.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms : a proposal from the international Lymphoma Study Group. **Blood**, **84** :1361-1392, 1994

HENDERSON, S.; ROWE, M.; GREGORY, C.; CROOM-CARTER, D.; WANG, F.; LONGNECKER, R.; KIEFF, E.; RICKINSON, A. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. **Cell**, **65**:1107-1115, 1991.

HERNDIER, B.; SHIRAMIZU, B.; JEWETT, N.; ALDAPE, K.; REYES, G.; McGARTH, M. Acquired immune deficiency syndrome-associated T- cell lymphoma: evidence for human immunodeficiency virus type-1 associated T-cell transformation. **Blood**, **79**:1768-1774, 1992.

HOOVER, R.N. Lymphoma risks in population with altered immunity- a search for mechanism. **Cancer**, **52**:5477, 1992.

INTERPRETATION and use of the Western-blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency type 1 virus infections. **MMWR: Morb. Mortl. Wkly. Rep.**, **38**:1-7, 1989. S-7.

INTERNATIONAL Collaboration on HIV and Cancer. Cancer Epidemiology unit, Imperial Cancer Research Fund (ICRF), Oxford, U.K. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. **J. Natl. Cancer Inst.**, **92**:1823-1830, 2000.

IZUMI, K.M.; KIEFF, E.D. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor-associated death domain protein to mediated B lymphocyte growth transformation and activate NF-kB. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 12592-12597, 1997.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H. (Eds.). **Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues** . Lyon: IARC Press/ World Health Organization, 2001.

KAHN, J.O.& WALKER, B. D. currents Concepts: acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **N. Engl. J. Med.**, **339**:33-39, 1998.

KAYE, K.M.; IZUMI, K.M.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:9150, 1993.

KENNETH, M. K. KENNETH, M.I.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:9150-9154, 1993.

KIRK, O.; PEDERSEN, C.; LEPRI-COZZI, A.; ANTUNES, F.; MILLER, V.; GATELL, J.M.; KATLAMA, C.; LAZZARIN, A.; SKINHØJ, P.; BARTON, S.E. for the EuroSIDA study group. Non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients in era of highly active antiretroviral therapy. **Blood**, **98**:3406-3412, 2001.

KLEIN, G.; KLEIN, E. Evolution of tumours and impact of molecular oncology. **Nature**, **315**:190-195, 1985.

KNOWLES, D.M. AIDS-associated lymphoid proliferations. In: KNOWLES, D.M. (Eds.). **Neoplastic Hematopathology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992. p. 773-835.

KNOWLES, D.M.; CHAMULAK, G.A.; SUBAR, M.; BURKE, J.S.; DUGAN, M.; WERNZ, J.; SLYWOTZKY, G.; PELICCI, G.; DALLA-FAVERA, R.; RHAPHAEL, B. Lymphoid neoplasias associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): the New York University Center experience with 105 patients (1981-1986). **Ann. Intern. Med.**, **108**:744-753, 1988.

KNOWLES, D.M.; PIROG, E.C. Pathology of AIDS-related lymphomas and other AIDS-defining neoplasms. **Eur. J. Can.** **37**:1236-1250, 2001.

KULWICHIT, W.; EDWARDS, R.H.; DAVENPORT, E.M.; BASKAR, J.F.; GODFREY, V.; RAAB-TRAUB, N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B-cell lymphoma in transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**:11963-11968, 1998.

LAWN, S.D.; SALVATORE, T.B.; FOLKS, T.M. Contribution of the immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clin. Micro. Rev.**, **14**(4): 753-777, 2001.

LEDERGERBER, B.; TELENTI, A.; EGGER, M. Risk of HIV related Kaposi's sarcoma and non-Hodkin's lymphoma with potent antiretroviral therapy: prospective cohort study. **Br. Med. J.**, **319**:23-24, 1999.

LEONARD, W.; O'SHEA, J. Jaks and stats: Biológico Implications. **Annu. Rev. Immunol.**, **16**:293-322, 1998.

LEVINE, A.M.; SULLIVAN-HALLEY, J.; PIKE, M.C.; RARICK, M.U.; LOUREIRO, C.; BERNSTEIN-SINGER, M.; WILLSON, E.; BRYNES, R.; PARKER, J.; RASHEED, S. Human immunodeficiency virus related lymphoma: Prognostic factors predictive of survival. **Cancer**, **68**:2466-2472, 1991.

LEVINE, A.M. AIDS-related malignancies: the emerging epidemic. **J. Natl. Cancer Inst.** **85**:1382-1397, 1993.

LEVINE, A.M. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma: clinical aspects. **Sem. Oncol.**, **27**:442-453, 2000.

LEVINE, A.M.; SCADDEN, D.T.; ZAIA, J.A.; KRISHNAN, A. Hematologic aspects of HIV/AIDS. **Hematology**, **1**:463-489, 2001.

LEVINE, A.M.; SENEVIRATNE, L.; ESPINA, B.M.; WOHL, A.R.; TULPULU, A.; NATHWANI, B.N.; GILL, P.S. Evolving characteristics of AIDS-related lymphoma. **Blood**, **96**:4084-4090, 2000.

LEVITSKAYA, J.; CORAM, M.; LEVITSKY, V.; IMREH, S.; STEINGEWALD-MULLEN, P.M.; KLEIN, G.; KURILA, M.G.; MASUCCI, M.G. Inhibition of antigen processing by internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. **Nature**, **375**:685-688, 1995.

LOMBARDI, L.; NEWCOMB, E.W.; DALLA-FAVERA, R. Pathogenesis of Burkitt's lymphoma: expression of non activated c-myc oncogene causes the tumorigenic conversion of EBV-infected human lymphoblasts. **Cell**, **49**:161-170, 1987.

MACIEJEWSKI, J.P.; WEICHOLD, F.F.; YOUNG, N.S. HIV-1 suppression of hematopoiesis in vitro mediated by envelope glycoprotein and TNF-alpha. **J. Immunol.**, **153**:4303-4310, 1994.

MARTIN, A.; FLAMAN, J.M.; FREBOUG, T.; DAVI, F.; EL MANSOURI, S.; AMOUROUX, J.; RAPHAEL, M. Functional analysis of the p53 protein in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas and polymorphic lymphoproliferations. **Br. J. Haematol.**, **101**: 311-317, 1998.

Mc CLAIN, K.; LEACH, C.T.; JRNSON, H.B.; JOSHI, V.V.; POLLOCK, B.H.; HUTCHISON, R.E.; MURPHY, S.B. Molecular and virologic characteristics of lymphoid malignancies in children with AIDS. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **23**:152-159, 2000.

MOCROFT, A.; KATAMA, C.; JOHNSON, A.M.; PRADIER, C.; ANTUNES, F.; MULCAHY, F.; CHIESI, A.; PHILLIPS, A.N.; KIRK, O.; LUNDGREN, J.D. AIDS across Europe, 1994-1998: The EuroSIDA STUDY. **Lancet**, **356**:291-296, 2000.

MOSES, A.V.; WILLIAMS, S.A.; STRUSSENBERG, J.G.; HENEVELD, R.L.; RUHL, R.A.; BAKKE, A.C.; BAGBY, G.C.; NELSON, J.A. HIV-1 induction of CD 40 on endothelial cells promotes the outgrowth of AIDS-associated B-cell lymphomas. **Nat. Med.**, **3**:1242-1249, 1997.

MORGADO, M.G.; GUIMARAES, M.L. and GALVAO-CASTRO, B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **97(2)**:143-150, 2002

MURRAY, R.J.; KURILLA, M.G.; BROOKS, J.M.; THOMAS, W.A.; ROWE, M.; KIEFF, E.; RICKINSON, A.B. Identification of target antigens for human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for immune control of EBV-positive malignancies. **J. Exp. Med.**, **176**:157-168, 1992.

NADOR, R.G.; CESARMAN, E.; CHADBURN, A.; DAWSON, D.B.; ANSARI, M.Q.; SALD, J.; KNOWLES, D.M. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. **Blood**, **88**:645-656, 1996.

NADOR, R.G.; CHADBURN, A.; GUNDAPPA, G.; CESARMAN, E. .; SAID, JW.; KNOWLES, D.M. Human immunodeficiency virus (HIV) associated polymorphic lymphoproliferative disorders. **Am. J. Surg. Pathol**, **27**:293-302,2003.

NATIONAL Cancer Institute Sponsored Study Of Classifications Of Non-Hodgkin's Lymphomas. Summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphom Pathologic Classification Project. **Cancer**, **49**: 2112- 2135, 1982

NAVARRO, J.T.; RIBERA, J.M.; ORIOL, A.; VAQUERO, M.; ROMEU, J.; BATLLE, M.; FLORES, A.; MILLÁ, F.; FELIU, E. Influence of highly active anti-retroviral therapy on response to treatment and survival in patients with acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma treated wth cyclophosphamide, hydroxydoxorubicin, vincristine and prednisone. **Br. J. Hematol.**, **112**:909-915, 2001.

NEAL, J.J.; FLEMING, P.L.; GREEN, T.A.; WARD, J.W. Trends in heterosexually acquired AIDS in United States, 1988 through 1995. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **14**:465-474, 1997.

NEWTON, R.; GRULICH, A.; BERAL, V.; SINDIKUBWABO, B.; NGILIMANA, P.J.; NGANYIRA, A.; PARKIN, D.M. Cancer and HIV infection in Rwanda. **Lancet**, **345**:1378-1379, 1995.

NEWTON, R.; ZIEGLER, J.; BERAL, V.; MIBIDDE, E.; CARPENTER, L.; WABINGA, H.; MBULALTEYE, S.; APPLEBY, P.; REEVES, G.; JAFFE, H.; Uganda kaposi's sarcoma study group. A case control study of human immunodeficiency virus infection and cancer in adults and children residing in Kampala, Uganda. **Int. J. Cancer**, **92**:622-627, 2001.

NIEDOBITEK, G.; MERU, N.; DELECLUSE, H.J. Epstein-Barr virus infection and human malignancies. **Int. J. Exp. Pathol.**, **82**:149-170, 2001.

NITSCHKE, F.; BELL, A.; RICKINSON, A.B. Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2 mediated transactivator of latent membrane protein 1 expression: a role for W1W2 repeat domain. **J. Virol.**, **71**:6619-6628, 1997.

PARKIN, D.M.; WABINGA, H.; NAMBOOZE, S.; WABWIRE-MAGEN, F. AIDS-related cancers in Africa: maturation of the epidemic in Uganda. **AIDS**, **13**:2563-2570, 1999.

PASTORE, C.; GAIDANO, G.; GHIA, P.; FASSONE, L.; CILIA, A.M.; GLOGHINI, A.; CAPELLO, D.; BUONAIUTO, D.; GONELLA, S.; RONCELLA, S.; CARBONE, A.; SAGLIO, G. Patterns of cytokine expression in AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. **Br. J. Haematol.**, **103**:143-149, 1998.

PELICCI, P.G.; KNOWLES, D.M.; ARLIN, Z.A.; WIECZOREK, R.; LUCIW, P.; DINA, D.; BASILICO, C.; DALLA-FAVERA, R. Multiple monoclonal B cell expansions and c-myc rearrangements in acquired immune deficiency syndrome-related lymphoproliferative disorders: implications for lymphomagenesis. **J. Exp Med.**, **164**:2049-2076, 1986.

PIO MARINS, J. R.; JAMALW, L.F.; CHEN, S.; HUDES, E.S.; BARBOSA JUNIOR, A.; BARROS, M.B.A.; CHEQUER, P.; TEIXEIRA, P.R.; HEARST, N. Sobrevivência atual dos pacientes com aids no Brasil. Evidência dos resultados de um esforço nacional. **Bol. Epidemiol. AIDS**, **15**:37-47, 2002.

PIOT, P.; BARTOS, M.; GHYS, P.D.; WALKER, N.; SCHWARTLÄNDER, B. The global impact of HIV/AIDS. **Nature**, **410**: 968-973, 2001.

POLYAK, S.; CHEN, H.; HIRSCH, D.; GEORGE, I.; HERSHBERG, S.; SPERBER, K. Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-1 infection. **J. Immunol.**, **159**:2177-2188, 1997.

PRZYBYLSKI, G.K.; GOLDMAN, J.; NG, V.L.; McGTATH, M.S.; HERNDIER, B.G.; SCHENKEIN, D.P.; MONROE, J.G.; SIBERSTEIN, L.E. Evidence for early B-cell activation preceding the development of Epstein-Barr virus-negative acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. **Blood**, **88**:4620-4629, 1996.

RABKIN, C.S.; QUAN-EN YANG; GOEDERT, J.J.; 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**, **93**:1838-1842, 1999.

RAPHAEL, J.; GENTILHOMME, O.; TULLIEZ, M.; BRYON, P. A. ; DIEBOLD, J. Histopathologic features of high grade non-Hodgkin's lymphomas in acquired immunodeficiency syndrome. The french study group of pathology for human immunodeficiency virus associated tumors. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **115**:15-20, 1991.

RICKINSON, A.B.; KIEFF, W. Epstein-Barr virus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. (Eds.). Philadelphia: Lipincott-Raven, 1996. p. 2397-2446. v.2.

ROSENBERG, S. Validity of the Ann Arbor Staging Classification for the non-Hodgkin's Lymphomas. **Cancer Trat. Rep.**, **61**:1023, 1977.

ROSSI, G.; DONISI, A.; CESARI, S.; RE, A.; CADEO, G.P.; CAROSI, G. The international prognostic index can be used as a guide to treatment decisions regarding patients with HIV related systemic non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer**, **86**:2391-2397, 1999

RUFF, P.; BAGG, A.; PAPADOPOULOS, K. Precursor T-cell lymphoma associated with human immunodeficiency virus (HIV) type-1: first reported case. **Cancer**, **64**:39, 1989.

SANTOS, R.A. **O estudo do encéfalo na síndrome de imunodeficiência adquirida na Bahia, Brasil**. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SCHOENBAUM, E.E.; HARTEL, D.; SELWYN, P.A.; KLEIN, R.S.; DAVENY, K.; ROGERS, M.; FEINER, C.; FREDLAND, G.. Risk factor for human immunodeficiency virus in intravenous drugs users. **N. Engl. J. Med.**, **321**:874-879, 1989.

SEPKOWITZ, K.A. Effect of HAART on natural history of AIDS-related opportunistic disorders. **Lancet**, **351**:228-230, 1998.

SHIBATA, D.; BRYNES, R.K.; RABINOWITZ, A.; HANSON, C.A.; SLOVAK, M.L.; SPIRA, T.J.; GILL, P. HTLV-1 associated adult T leukemia lymphoma-leukemia in a patient infected with HIV-1. **Ann. Intern. Med.**, **111**:871-875, 1989.

SITAS, F.; PACELLA-NORMAN, R.; CARRARA, H.; PATEL, M.; RUFF, P.; JENTSCH, U.; HALE, M.; ROWJI, P.; SAFFER, D.; CONNOR, M.; BULL, D.; NEWTON, R.; BERAL, V. The spectrum of HIV-1 related cancers in South Africa. **Int. J. Cancer**, **88**:489-492, 2000.

STRAUS, D.J.; JUANG, J.; TESTA, M.A., LEVINE, A.M.; KAPLAN, L.D. Prognostic factors in the treatment of HIV associated non-Hodgkin's lymphoma: analysis of AIDS clinical trials group protocol 142: low dose versus standard dose m-BACOD plus GM-CSF. **J. Clin. Oncol.**, **16**:3601-3606, 1998

SWERDLOW, A. J. Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**; **30**: S3-S12, 2003.

TERAMOTO, N.; SARKER, A.B.; TONOYAMA, Y.; YOSHINO, T.; HAYASHI, K.; TAKAHASHI, K.; AKAGI, T. Epstein-Barr virus infection in neoplastic and non-neoplastic cells of lymphoid malignancies. **Cancer**, **77**:2339-2347, 1996.

TIRELLI, U.; SPINA, M.; GAIDANO, G.; VACCHER, E.; FRANCESCHI, S.; CARBONE, A. Epidemiological, biological and clinical features of HIV-related lymphomas in era of highly active antiretroviral therapy. **AIDS**, **14**:1675-1688, 2000.

TIRELLI, U.; SPINA, M.; de PAOLI, P.; SERRAINO, D.; CARBONE, A. HCV and HIV-related non-Hodgkin lymphoma. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **14**:80-81, 1997.

TIRELLI, U.; VACCHER, E.; ZAGONEL, V.; TALAMI, R.; BERNARDI, D.; TAVIO, M.; GLOGHINI, A.; MEROLA, M.C.; MONFARDINI, S.; CARBONE, A. CD30 (Ki-1) positive anaplastic large-cell lymphomas in 13 patients with and 27 patients without human immunodeficiency virus infection: the first comparative clinicopathologic study from a single

institution that also includes 80 patients with other human immunodeficiency virus-related systemic lymphomas. **J. Clin. Oncol.**, **13**:373-380, 1995.

TOMKINSON, B.; ROBERTSON, E.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA 3A e EBNA 3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. **J. Virol.**, **67**:2014-2025, 1993.

ULLUM, H.; GOTZSCHE, P.C.; VICTOR, J.; DICKMEISS, E.; SKINHOS, P.; PEDERSEN, B.K. Defective natural immunity: an early manifestation of human immunodeficiency virus infection. **J. Exp. Med.**, **182**:789-799, 1995.

UNAIDS- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. AIDS. World Health Organization (WHO) UNAIDS/02.58E. **AIDS epidemic update December 2002**. Report 1.12.2002, pp 03-06. http://www.unaids.org/html/pub/publications/irc-pub03/epiupdate_2002_en_pdf.pdf.

VERGIS, E.N. & MELLORS, J.W. Natural history of HIV-1 infection. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, **14**: 809-825, 2000.

VOLM, M.; VON ROENN, J. Non-AIDS defining malignancies in patients with HIV infection. **Curr. Opin. Oncol.**, **8**:386-391, 1996.

WARD, J.M.; O'LEARY, T.J.; BASKIN, G.B.; BENVENISTE, R.; HARRIS, C. A.; NARA, P.L.; RHODES, R.H. Immunohistochemical localization of human and simian immunodeficiency viral antigens in fixed tissue sections. **Am. J. Pathol.**, **127**:199-205, 1987.

WILSON, J.B.; LEVINE. A.J. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasias in transgenic mice. **EMBO J.**, **15**: 3117-3126, 1996

YOUNG, L. & MURRAY, P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. **Oncogenes**, **22**:5108-5121, 2003

YOUNG-HYEH, Ko.; JUNG-DAI, L. EBV in situ hybridization study for non-Hodgkin's lymphomas. **J. Korean Med. Sci.**, **9**:224-229, 1994.

YOUNG, L.; ALFERI, C.; HENNESSY, K.; EVANS, H.; O'HARA, C.; ANDERSON, K.C.; RITZ, J.; SHAPIRO, R.S.; RICKINSON, A.; KIEFF, E.; COHEN, J.I. Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. **N. Engl. J. Med.**, **321**:1080-1085, 1989.

ZAAIJER, H.L.; EXEL-OEHLERS, P.V.; KRAAIJEVELD, T.; ALTENA, E.; LELIE, P.N. Early detection of antibodies to HIV-1 by third-generation assays. **Lancet**, **340**:770-772, 1992.

ZIEGLER, J.L.; BECKSTEAD, J.A.; VOLBERDING, P.A.; ABRAMS, D.I.; LEVINE, A.M.; LUKES, R.J.; GILL, P.S.; BURKES, R.L.; MEYER, P.R.; METROKA, C.E. Non – Hodgkin's lymphoma in 90 homosexual men: relation to generalized lymphadenopathy and the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, **311**:565-570, 1984.

ZIEGLER, J.L.; DREW, W.L.; MINER, R.C.; MINTZ, L.; ROSENBAUM, E.; GERSHOW, J.; LENNETTE, E.T.; GREENSPAN, J.; SHILLITOE, E.; BECKSTEAD, J.; CASAVANT, C.; YAMAMOTO K. Outbreak of Burkitt's like-lymphoma in homosexual men. **Lancet**, **2**:631-633, 1982.

ZUCKERMAN, E.; ZUCKERMAN, T.; LEVINE, A.M, DOUER, D.; GUTEKUNST, K.; MIZOKAMI, M.; QIAN, D.G.; VELANKAR, M.; NATHWANI, B.N.; FONG, T.L. Hepatitis C virus infection in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. **Ann. Intern. Med.**, **127**:423-428, 1997.

ANEXO**IMUNOISTOQUÍMICA PELO MÉTODO STREPTOAVIDINA-BIOTINA-
PEROXIDASE**

1. Cortar e colocar as secções em lâminas preparadas (estufa por 24 horas a 40°C antes de começar a reação).
2. Colocar as lâminas em estufa por 1 hora a 60°C (antes do início da reação).
3. Desparafinizar as secções (xilol 2x\5mim cada), desidratar em álcool absoluto (2x\5 mim cada) e hidratar com água destilada. Passar para cubeta com PBS.
4. Recuperação antigênica – Diluir o tampão citrato (1:10), colocar para ferver na panela de pressão. Quando entrar em ebulição, mergulhar as lâminas (na cubeta apropriada) e fechar a panela. Deixar por 5 minutos ou 2 minutos a contar a partir do aparecimento da 2ª linha. As lâminas também podem ser incubadas em tampão citrato pré-aquecido em banho-maria à 90°C por 40 minutos.
5. Colocar em uma cubeta com PBS
6. Incubar as secções com anticorpo primário (cada anticorpo apresenta diluição previamente padronizada – 100µl/lâmina) por 40 min a 30°C.
7. Lavar as secções em PBS (2x).

8. Incubar as secções com anticorpo secundário – 100µl/lâmina (Para anticorpos monoclonais: Rabbit anti-mouse biotinilado – Para anticorpos policlonais: Swine anti-rabbit biotinilado), por 30 min a 30°C.
9. Lavar as secções em PBS (2x).
10. Aplicar o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (100µl/lâmina), previamente diluído e incubar por 30 min a 30°C.
11. Lavar as secções em PBS (2x).
12. Diluir o cromógeno (DAB 1 gota / 1mL de tampão) incubar por +/-5 min (100µl/lâmina) até corar de castanho.
13. Lavar as secções em PBS e em água corrente.
14. Contracorar com hematoxilina (1-3 min), desidratar em álcool (2x) clarificar com xilol (2x), deixar no xilol até montar.
15. Montar as lâminas com bálsamo do Canadá (bálsamo na lamínula-sobrepõe a lâmina – mergulha no xilol e limpa com papel cuidadosamente).