

Impacto da expressão de EBV, PD-1 e PD-L1 na Sobrevida Global e Livre de Eventos em pacientes infanto-juvenis com Linfoma de Hodgkin de centro de referência em oncologia em Recife (Brasil)

Impact of EBV, PD-1 and PD-L1 expression on Global Event-Free Survival in children and juvenile patients with Hodgkin's Lymphoma from a reference center in oncology in Recife (Brazil)

Thuanne Beatriz Silva Tenório^{1,2}, Neila Caroline Henrique da Silva², Larissa Albuquerque Paiva³, Erika Furtado de Azevedo⁴, Christina Alves Peixoto⁵, George Tadeu Nunes Diniz⁶, Francisco Pedrosa⁷, Renata dos Santos Almeida², Norma Lucena-Silva^{2,4*}

1 – Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Brasil.

2 – Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, Brasil.

3 – Laboratório de Patologia, Centro Integrado de Citopatologia e Colposcopia, Recife, Brasil.

4 – Oncologia Pediátrica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, Brasil.

5 – Laboratório de Ultraestrutura, Departamento de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, Brasil.

6 – Núcleo de Estatística e Geoprocessamento, Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Recife, Brasil.

7 – Real Oncopediatria, Real Hospital Português, Recife, Brasil.

*Autor de correspondência:

Dra. Norma Lucena-Silva (PhD)

Laboratório de Biologia Molecular

Departamento de Oncologia Pediátrica

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP

Rua dos Coelhos, 550, Boa Vista, 50070-550

Recife, Pernambuco, Brasil

e-mail: norma.lucena@hotmail.com

RESUMO EXPANDIDO

Objetivos: O Linfoma de Hodgkin (LH) representa cerca de 8,4% dos cânceres pediátricos no Brasil, porém as características moleculares alteradas do LH ainda não são totalmente elucidadas. Biomarcadores têm sido avaliados para compreensão da patogênese do LH e possíveis aplicações clínicas. **Materiais e Métodos:** Foi construída coorte retrospectiva de pacientes com diagnóstico de LH (até 18 anos), admitidos no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, de 1996-2014 que possuíam blocos de parafina disponíveis. Foram obtidas informações clínicas e de desfecho em prontuário. Os experimentos de imunohistoquímica (IHQ) foram feitos com anticorpos anti-LMP1 (Monoclonal Anti-EBV, LMP clones CS.1-4); Anti-PD-1 (Monoclonal Anti-PD-1, clone NAT105); e anti-PD-L1 (Monoclonal Anti-PD-L1, clone ABM4E54). Foi realizada análise qualitativa das lâminas por dois observadores, e análise quantitativa das lâminas com determinação de valor em pixel pelo programa GIMP, e definição de valor de ponto de corte por curva ROC para desfecho desfavorável. Foi realizada descrição e associação das análises quantitativas e qualitativas das lâminas de IHQ com desfecho desfavorável (óbito+recaída), resposta ao tratamento e estadió por teste exato de Fisher. Foi analisada sobrevida geral (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE) por Kaplan-Meier (período de censura=60 meses). Os programas SPSS e GraphPad Prism foram utilizados, considerando $P \leq 0,05$. **Resultados:** Os pacientes EBVs negativos exibiram tendência para redução da SG ($P=0,080$) e da SLE ($P=0,060$). O ponto de corte selecionado para PD-1 foi de 37.943 pixels (1,2% de positividade no tecido, sensibilidade=80%; especificidade=87,9%) e para PD-L1 foi de 44.065 pixels (1,4% de positividade; sensibilidade=80%; especificidade=84,8%). A expressão de PD-1 >1,2% foi associada a estadió precoce ($P=0,001$). A positividade de PD-1 <1,2% agregado ao PD-L1 >1,2% no tecido foi associado a estadió tardio ($P=0,003$) e à diminuição da SG ($P=0,046$). O PD-

1>1,2% no tecido associado ao aumento de PD-L1 apresentou relação com características de melhor prognóstico (menor taxa de óbito($P=0,057$) e aumento de SLE($P=0,028$); quando PD-L1>1,4%, houve associação com estadio precoce($P=0,050$), e aumento de SG($P=0,029$)). **Discussão:** O status do PD-1 agregado ao aumento do PD-L1 mostrou impacto na sobrevida e prognóstico neste estudo. Isto pode ter ocorrido devido a resposta imune exacerbada que provoca um infiltrado inflamatório intenso, visto que com a redução de PD-1 há menos interação desta com o PD-L1, o que pode levar a maior ativação de linfócitos T. Outros estudos sugerem haver uma relação entre a ocorrência de LH e doenças autoimunes em crianças. **Conclusão:** A baixa expressão do PD-1 agregada ao aumento de expressão do PD-L1 foi associada à redução da SG e estadio tardio. Também foi demonstrada associação entre uma maior expressão de PD-1 juntamente com PD-L1 e a melhora na SG e SLE, diminuição da ocorrência de óbito e estadio precoce.

Palavras-chaves: Doença de Hodgkin, pediatria, biomarcadores, prognóstico.

RESUMO

Objetivos: O Linfoma de Hodgkin (LH) representa cerca de 8,4% dos cânceres pediátricos no Brasil, porém as características moleculares alteradas do LH ainda não são totalmente elucidadas. Biomarcadores têm sido avaliados para compreensão da patogênese do LH e possíveis aplicações clínicas. **Métodos:** Foi construída coorte retrospectiva de crianças com diagnóstico de LH admitidas no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, de 1996-2014 que possuíam blocos de parafina disponíveis. Foram obtidas informações clínicas e desfecho em prontuário. Foram feitas análise de Imunohistoquímicas(IHQ) para EBV, PD-1 e PD-L1 qualitativa e quantitativa com definição de *cutoff* por curva ROC. Foi realizada descrição e associação das análises quantitativas e qualitativas das lâminas de IHQ com variáveis clínicas, de desfecho e análise de sobrevida geral (SG) e sobrevida livre de eventos (SLE). Foi considerado $P \leq 0,05$. **Resultados:** A expressão de PD-1 >1,2% foi associada a estadio precoce($P=0,001$). A positividade de PD-1 <1,2% agregado ao PD-L1 >1,2% no tecido foi associado a estadio tardio($P=0,003$) e diminuição da SG($P=0,046$). O PD-1 >1,2% no tecido associado ao aumento de PD-L1 apresentou relação com características de melhor prognóstico(quando a célula maligna estava mais intensa que as células do infiltrado inflamatório foi observado associação com menor taxa de óbito($P=0,057$) e aumento de SLE($P=0,028$); quando PD-L1 >1,4%, houve associação com estadio precoce($P=0,050$), e aumento de SG($P=0,029$)). **Conclusão:** A baixa expressão do PD-1 agregada ao aumento de expressão do PD-L1 foi associada à redução da SG e estadio tardio. Também foi encontrado maior expressão de PD-1 e maior expressão de PD-L1, associados a melhora na SG e SLE, diminuição da ocorrência de óbito e estadio precoce.

Palavras-chaves: Doença de Hodgkin, pediatria, biomarcadores, prognóstico.

ABSTRACT

Objectives: Hodgkin's Lymphoma (LH) represents about 8.4% of pediatric cancers in Brazil, but the altered molecular characteristics of LH are not yet fully elucidated. Biomarkers have been evaluated for understanding LH pathogenesis and possible clinical applications. **Methods:** A retrospective cohort of children diagnosed with LH admitted to the Professor Fernando Figueira Institute of Integral Medicine between 1996 and 2014, who had available paraffin blocks, was constructed. Clinical and laboratorial information and outcome were obtained from medical record. Qualitative and quantitative immunohistochemical (IHC) analysis was performed for EBV, PD-1 and PD-L1 with cutoff definition by ROC curve. A descriptive and association analysis of the IHC findings with clinical variables, and also outcome, general survival (SG) and event-free survival (SLE) variables were performed. It was considered $P \leq 0.05$. **Results:** PD-1 expression $> 1.2\%$ was associated with early stage ($P = 0.001$). PD-1 positivity $< 1.2\%$ with PD-L1 $> 1.2\%$ in tissue was associated with late stage ($P = 0.003$) and decreased SG ($P = 0.046$). PD-1 $> 1.2\%$ with increased PD-L1 was associated with better prognostic characteristics (when labeling in the malignant cell was more intense than the inflammatory infiltrate cells). In this case, it was observed an association with a lower death rate ($P = 0.057$) and an increased in SLE ($P = 0.028$). Furthermore, PD-L1 $> 1.4\%$ was associated with early stage ($P = 0.050$) and increased SG ($P = 0.029$). **Conclusion:** Low PD-1 expression with increased PD-L1 expression was associated with reduced SG and late stage. Higher PD-1 expression and higher PD-L1 expression were also found, associated with improved SG and SLE, decreased death and early stage.

Key-words: Hodgkin disease, childhood, biomarkers, prognosis

INTRODUÇÃO

Os Linfomas são uma das neoplasias malignas mais comuns da infância, sendo o segundo tipo mais frequente em crianças de países em desenvolvimento, e o terceiro em países desenvolvidos^{1,2}. No Brasil, o Linfoma de Hodgkin (LH) representa cerca de 8,4% dos cânceres pediátricos³, com predomínio no sexo masculino e média de idade de 10 anos⁴. O LH é uma neoplasia caracterizada pela malignização de linfócitos B, originando as Células de Reed-Sternberg (RS), as células de Hodgkin (CH) e variantes. A neoplasia ocorre no sistema linfático e reticulo-endotelial^{5,6} e o diagnóstico é confirmado por meio de exame anatomopatológico de biópsia de linfonodo suspeito⁶.

O microambiente do LH é composto majoritariamente por infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos, células estromais e fibroblastos, sendo as células transformadas a população minoritária do microambiente tumoral, compondo cerca de 10% deste⁴. A etiologia e patogênese do LH ainda não estão totalmente esclarecidas. Entretanto, a associação com o vírus Epstein-Barr (EBV) em crianças tem sido relatada na literatura, com estudos que apontam a identificação do vírus em até 90% dos casos em países em desenvolvimento e cerca de 30-50% dos casos de países desenvolvidos^{4,7}.

As características moleculares e vias biológicas alteradas do LH, tanto nas células transformadas quanto em seu infiltrado inflamatório, ainda não são completamente elucidadas⁸. Neste contexto, alguns biomarcadores têm sido estudados para a compreensão da patogênese da doença e possíveis aplicações clínicas, como valor prognóstico, impacto na sobrevida e alvo para imunoterapia⁸. Dentre estes biomarcadores, o *Programmed cell death protein-1* (PD-1) e o *Programmed cell death protein- ligand 1* (PD-L1) têm sido estudados em outros tipos de câncer e no LH em adultos, com poucos estudos em LH em crianças^{9,10}.

Ambas as moléculas PD-1 e o PD-L1 são proteínas relacionadas a resposta imune do hospedeiro^{9,10}. O PD-1 é um receptor imunológico de células T, B, *natural killer* (NK) e monócitos, que controla as respostas imunológicas citotóxicas, contribuindo para a manutenção da autotolerância^{11,12}. O PD-1 tem dois ligantes, o PD-L1 e o PD-L2, que são expressos tanto nas células transformadas quanto em leucócitos presentes no infiltrado inflamatório^{11,12}. A interação entre PD-1 e PD-L1 causa a inibição da ativação de linfócitos T, diminuindo a produção de citocinas, e pode levar à evasão do câncer ao ataque pelo sistema imune⁹⁻¹².

Devido à escassez de pesquisas sobre o significado clínico e contribuição de marcadores moleculares na patogênese do LH na população pediátrica, sobretudo em âmbito regional e nacional, este estudo tem como objetivo detectar o EBV, e avaliar a expressão de PD-1 e PD-L1 em biópsias diagnósticas de LH em crianças de um centro de Oncologia em Recife, Brasil.

MÉTODOS

Aspectos éticos

O estudo seguiu as recomendações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital IMIP sob o número CAAE 93277718.8.0000.5201.

População de estudo

Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico histológico de Linfoma de Hodgkin, com até 18 anos de idade, e admitidos no Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), entre 1996 e 2014

e que possuíam blocos de parafina no serviço. Foram excluídos do estudo pacientes cujos blocos de parafina não foram encontrados ou que estavam inadequados para realização dos experimentos.

Definições

Foram obtidas informações nos prontuários sobre as variáveis sexo, idade, diagnóstico e data de diagnóstico, variáveis clínicas *Bulk disease* mediastinal (considerado presente quando a massa mediastinal era maior que 1/3 do diâmetro do tórax) e sintomas B, e variáveis laboratoriais como Hemoglobina, Velocidade de Hemossedimentação (VSH) e Desidrogenase Lática (DHL), valores de imunohistoquímica diagnóstica referente aos marcadores CD15, CD20 e CD30 e protocolo utilizado (SJCRH 1980, HOD-94, HOD-08/99 modificado (com a substituição da mecloretamina por ciclofosfamida) e ABVD).

As seguintes variáveis foram avaliadas em relação à detecção de EBV e expressão de PD-1 e PD-L1: estadiamento (classificação Ann Arbor), resposta ao tratamento (Resposta completa ou outras respostas (parcial ou doença em progressão)) e desfecho (favorável (cura) ou desfavorável (óbito e/ou recaída)).

Análise Imunohistoquímica

Os experimentos de imunohistoquímica foram realizados no Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE. Os blocos de parafina foram cortados com o micrótomo manual (American Optical, Rotary, Leyca RM2125RT) com espessura de 4 µm. Foi empregado o Kit Dako EnVision™ FLEX+ (Código K8002, Dako Laboratories – Carpinteria, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados e incubados *overnight*: anti-LMP1 (Monoclonal Mouse Anti-

EBV, LMP clones CS.1-4, IR753, Dako; Recuperação antigênica com Tris-EDTA); Anti-PD-1 (Monoclonal Mouse Anti-PD-1, clone NAT105, ab52587, Abcam; Recuperação antigênica com Citrato); e anti-PD-L1 (Monoclonal Mouse Anti-PD-L1, clone ABM4E54, ab210931, Abcam; Recuperação antigênica com Citrato).

Foi utilizado como controle positivo do PD-1, o centro germinativo do linfonodo de cada paciente e como controle positivo do PD-L1 os pacientes com Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocítica Nodular. Para controles positivos do EBV, foram utilizados como parâmetros os pacientes sabidamente positivos cuja detecção foi realizada previamente ao diagnóstico por Hibridização *in Situ* ou Imunohistoquímica. Também foram considerados controles negativos da técnica durante os experimentos.

As lâminas de imunohistoquímica foram visualizadas e fotografadas em microscópio invertido (Observer Z1, Zeiss MicroImaging, GmbH, Alemanha) equipado com câmera AxionCam MRm Zeiss versão 4.7.4 e *software* LAS EZ (Leica Microsystems, Suíça) de análise de imagem. As imagens foram obtidas em uma ampliação de 400x em quadruplicata, sendo realizadas análises quantitativas por contagem de pixels por meio do programa GIMP[®] versão 2.10.12 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX). Nesta análise quantitativa não foi possível diferenciar a marcação das células malignas e do infiltrado inflamatório.

A análise qualitativa foi realizada por dois observadores. A análise referente à presença do EBV foi classificada como positivo ou negativo de acordo com a presença de marcação citoplasmática na célula transformada (célula Reed-Sternberg e/ou célula de Hodgkin e suas variantes). O PD-1 foi considerado positivo na presença de rosetas ao redor da célula maligna e o PD-L1 foi considerado positivo quando presente em membrana/citoplasma das células T do infiltrado inflamatório e/ou células malignas e teve sua expressão graduada de acordo com a intensidade (de uma a três cruzes). Também

foi observado se a célula transformada apresentava maior ou igual intensidade de expressão de PD-L1 às células do infiltrado inflamatório.

Análise estatística

Os dados clínico-demográficos, laboratoriais e experimentais foram digitados em planilha do programa Microsoft® Excel. Em relação à análise qualitativa das lâminas, foi realizado índice Kappa para avaliar a concordância de resultados entre os observadores. Sobre a análise quantitativa das lâminas, para determinação de valor em pixel de cada lâmina, foi realizado uma média das quatro imagens, o que gerou um valor para cada paciente. Os valores obtidos para cada molécula considerando todos os pacientes foram analisados por meio de Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinação do valor de ponto de corte de cada proteína ajustado ao desfecho desfavorável (Sensibilidade e especificidade $\geq 80\%$). A partir disso, os pacientes foram categorizados em dois grupos (1- abaixo do ponto de corte, 2- acima do ponto de corte).

Foi realizada uma análise descritiva das variáveis clínico-demográficas, laboratoriais e de imunohistoquímica, com aplicação de teste exato de Fisher para determinar associação com desfecho desfavorável, resposta ao tratamento e estadiamento. Também foi realizada análise de sobrevida geral (status óbito) e sobrevida livre de eventos (status óbito e recaída) pelo método de Kaplan-Meier, sendo considerado um período de censura de 5 anos (60 meses) contabilizado a partir da data de diagnóstico.

Os programas IBM SPSS ® versão 20 (SAS Institute, Cary, NC) e GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.) foram utilizados, sendo considerados significantes valores de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Descrição da população

Foram identificados 129 pacientes entre 1996 e 2014. Destes, foram encontrados blocos de parafina de 60 pacientes, sendo 11 deles excluídos por não apresentarem material suficiente ou adequados para realização dos experimentos de imunohistoquímica. Dos 49 pacientes incluídos no estudo, 34 (69,4%) são do sexo masculino e 15 (30,6%) do sexo feminino, com média de idade de 10,5 anos e mediana de 11 anos de idade ao diagnóstico. As características clínico-demográficas, radiológicas, laboratoriais, de imunohistoquímica diagnóstica encontram-se na Tabela 1.

Em relação ao diagnóstico histológico, foram observados 42 pacientes com Linfoma de Hodgkin Clássico, sendo 15 deles (30,6%) com o subtipo Esclerose Nodular, 20 pacientes (40,8%) com o subtipo Celularidade Mista, 6 pacientes (12,2%) com o subtipo Rico em Linfócitos e 1 paciente (2,1%) com o subtipo Depleção Linfocitária. O tipo Linfoma de Hodgkin - Predominância Linfocítica Nodular foi observado em 7 pacientes (14,3%). O estadioprecoce foi encontrado em 30 pacientes (61,2%) e o tardio em 19 pacientes (38,8%).

Os protocolos de tratamento utilizados foram SJCRH 1980 (1 paciente; 2%); HOD-94 (23 pacientes; 46,9%); HOD-08/99 modificado (22 pacientes; 44,9%); ABVD (3 pacientes; 6,1%). Foi observada resposta completa ao tratamento em 30 (61,2%) dos pacientes. Em relação ao desfecho, 34 (69,4%) pacientes obtiveram cura e 15 (30,6%) pacientes tiveram desfecho desfavorável.

EBV

A positividade para o EBV foi encontrada em 25 pacientes (51%) (Figura 1). Dos 6 pacientes que vieram a óbito, 5 eram EBVs negativos, e dos 12 pacientes que tiveram

recaída, 6 eram EBVs negativos. A positividade para o EBV não foi associada ao diagnóstico histológico, estadiamento, resposta ao tratamento, desfecho desfavorável nem à expressão de PD1 e PD-L1. No entanto, os pacientes EBVs negativos apresentaram tendência para diminuição da sobrevida geral ($P=0,080$) e da sobrevida livre de eventos ($P=0,060$) (Figura 2).

PD-1

A positividade para PD-1 considerando a formação de rosetas completas ao redor da célula transformada foi encontrada em 9 (18,4%) pacientes (Figura 1), e apenas dois destes tiveram recaída e nenhum deles veio a óbito. Em relação à análise quantitativa por contagem de pixels, a positividade para PD-1 variou de 0,1% a 11,2%, com média de 99.656,5 pixels, o que corresponde a 3,2% de positividade na lâmina. Por análise de curva ROC, foi obtido o valor 37.943 pixels como ponto de corte, o que corresponde a 1,2% de positividade na lâmina, com 80% de sensibilidade e 87,9% de especificidade para desfecho desfavorável. A expressão de PD-1 relativa à contagem de pixels maior que 1,2% mostrou-se associada ao estadiamento precoce ($P=0,001$). A análise de sobrevida geral e livre de eventos de PD-1 não se mostrou significativa.

PD-L1

A positividade para PD-L1 foi encontrada em 47 (95,9%) pacientes, tendo sido considerada e analisada independentemente para a célula transformada e para o infiltrado inflamatório. Nestes pacientes, foi observada diferença de intensidade de positividade (de 1+ a 3+) entre os dois tipos celulares considerados (Figura 1), sendo 27 (57,4%) lâminas com intensidade de marcação maior na célula transformada do que no infiltrado inflamatório e 20 (42,6%) com intensidade igual de célula transformada e células do

infiltrado inflamatório. Dos 33 pacientes que obtiveram cura, 21 deles apresentaram maior intensidade de expressão na célula transformada em relação as células do infiltrado inflamatório. A intensidade de expressão de PD-L1 (maior positividade) em células malignas em relação às células do infiltrado inflamatório nos pacientes mostrou uma tendência para associação com o estadiamento da doença ($P= 0,069$).

Quanto a análise quantitativa por contagem de pixels, a positividade para PD-L1 foi de 0,3 a 7,1% da lâmina, com média de 85.503 pixels, o que representa 2,7% de positividade na lâmina. Na análise de curva ROC, foi selecionado o ponto de corte de 44.065 (1,4% de positividade) por apresentar 80% de sensibilidade e 84,8% de especificidade para desfecho desfavorável. Dos 15 pacientes que tiveram desfecho desfavorável, 12 deles apresentaram mais de 1,4% de positividade para o PD-L1. A análise de sobrevida geral e livre de eventos de PD-L1 não foi estatisticamente significativa.

Associação entre PD-1 e PD-L1

Em relação ao estadiamento, foram observadas as seguintes associações: 1-maior expressão de PD-1 ($> 1,2\%$ de positividade na lâmina) juntamente com expressão mais intensa de PD-L1 na célula maligna em relação ao infiltrado com estadio precoce ($P= 0,003$); 2- menor expressão de PD-1 ($< 1,2\%$ de positividade na lâmina) agregada a maior expressão de PD-L1 ($> 1,4\%$ de positividade na lâmina) com estadio tardio ($P= 0,003$); e 3- maior expressão de PD-1 no tecido ($> 1,2\%$ de positividade na lâmina) agregada a maior expressão de PD-L1 ($> 1,4\%$ de positividade na lâmina) com estadio precoce ($P= 0,050$).

Em relação aos desfechos, mostrou-se significativa a associação de maior expressão de PD-1 no tecido ($> 1,2\%$ de positividade na lâmina) juntamente à expressão

mais intensa de PD-L1 na célula maligna em relação ao infiltrado inflamatório com maior taxa de cura ($P= 0,057$). A expressão de PD-1 em mais de 1,2% da lâmina associada à expressão de PD-L1 em mais de 1,4% da lâmina foi relacionada a menor ocorrência de óbito ($P= 0,056$).

Os pacientes que apresentaram expressão de PD-1 em menos de 1,2% da lâmina e de PD-L1 em mais de 1,4% da lâmina exibiram menor taxa de sobrevida global ($P= 0,046$) (Figura 3). Em contrapartida, os pacientes que tiveram expressão de PD-1 em mais de 1,2% da lâmina e de PD-L1 em mais de 1,4% da lâmina foram associados a maior taxa de sobrevida global ($P= 0,029$) (Figura 3). A positividade para PD-1 em mais de 1,2% da lâmina associado a maior positividade de PD-L1 na célula transformada em relação ao infiltrado inflamatório apresentou associação com maior sobrevida livre de eventos em relação a outras combinações ($P= 0,028$) (Figura 4).

DISCUSSÃO

Neste trabalho, as características clínico-demográficas, laboratoriais e radiológicas foram semelhantes a de outros estudos brasileiros e de países em desenvolvimento^{7,13,14,15}. A frequência de expressão de CD15, CD30 e CD20 foi semelhante ao encontrado na literatura^{4,16,17}.

A positividade para EBV encontrada em 51% dos pacientes é semelhante a de outros estudos brasileiros^{18,19}. Foi observado em outras pesquisas uma tendência bimodal da presença do EBV, sendo mais prevalente em indivíduos com LH mais jovens, abaixo de 10 anos e em pacientes acima dos 45 anos, de países em desenvolvimento^{13,20,18,21}. Em nossa população, observamos uma média de idade de 10,5 anos, o que corrobora com nossos dados.

Em nossa população foi observada uma tendência para diminuição da sobrevida global e livre de eventos de pacientes EBV negativos, algo que pode não ter sido significativo devido ao tamanho pequeno de nossa amostra. A relação da positividade do EBV com a sobrevida e significado prognóstico do mesmo ainda é algo controverso na literatura^{13,20,21,22}. Neste sentido, Myriam et al. sugerem a existência de que o impacto prognóstico da positividade do EBV seja relevante apenas para um grupo particular de pacientes com Linfoma de Hodgkin, sendo estes principalmente em estádios iniciais²¹.

Neste estudo, observamos que a presença de positividade de PD-1 menor que 1,2% do tecido associado ao PD-L1 maior que 1,2% do tecido esteve associada a estadio mais avançado da doença (P=0,003) e à diminuição da Sobrevida Global dos pacientes (P=0,046). Em contrapartida, a expressão de PD-1 em mais de 1,2% da lâmina agregado ao aumento de PD-L1 apresentou relação com características relacionadas a melhor prognóstico (quando a célula maligna estava mais intensa que as células do infiltrado inflamatório foi observado associação com menor taxa de óbito (P=0,057) e aumento de SLE (P=0,028); quando PD-L1 foi expresso em mais de 1,4%, houve associação com estadio precoce (P=0,050), e aumento de Sobrevida Global (P=0,029)). Estas informações sugerem que o status do PD-1 associado a um aumento do PD-L1 impacta diretamente a sobrevida e outras características prognósticas.

A interação entre PD-1 e PD-L1 promove evasão do sistema imune do hospedeiro, por meio da diminuição da ativação de células T, garantindo longevidade à célula transformada⁹⁻¹². Diferente do esperado, que seria o aumento de PD-1 e de PD-L1 associado a pior prognóstico, fato observado em outros estudos em adultos^{11,12,23,24}, no presente estudo, os pacientes com prognósticos mais pobres apresentaram diminuição do PD-1 associado ao aumento de PD-L1. Este resultado pode ter ocorrido devido a uma resposta imune exacerbada que provoca um infiltrado inflamatório muito intenso, visto

que com a diminuição de PD-1 há menos interação desta molécula com o PD-L1, o que pode ser traduzido em maior ativação de linfócitos T⁹⁻¹². Já foi observada uma possível relação entre a ocorrência de LH e doenças autoimunes em crianças²⁵⁻²⁷.

Desta forma, pacientes com prognósticos mais sombrios apresentam diminuição do PD-1, e como este é um receptor de células B, T, NK, há uma diminuição da resposta imunológica citotóxica e de reconhecimento de autoantígenos^{11,12}. Ao mesmo tempo, observou-se aumento de PD-L1, com intensidade de marcação ainda maior na célula transformada. Assim, a interação entre PD-1 e PD-L1 promove evasão do sistema imune do hospedeiro, garantindo a célula transformada longevidade⁹⁻¹².

A associação da positividade do PD-1 maior que 1,2% do tecido com o estadió precoce ressalta a importância da desregulação dessa proteína na patogênese do LH. Além disso, a diferença entre as associações com o PD-1 para melhor ou pior prognóstico infere que é a alteração de expressão nesta proteína que está tendo maior impacto no desfecho.

No entanto, este estudo de imunohistoquímica não nos permite afirmar se há essa diminuição de PD-1 por ela não ser reconhecida por estar ligada ao PD-L1 ou se há uma regulação negativa da molécula. Da mesma forma, não é possível afirmar se há uma regulação positiva na expressão de PD-L1 ou se com a diminuição do PD-1 há mais PD-L1 livre. Por isso, estudos de biologia molecular podem ser úteis para maior conhecimento acerca da patogênese dessa via de regulação imunológica relacionada ao LH.

Até o momento, não foram encontrados na literatura outros estudos que relacionem a expressão de PD-1 e PD-L1 à sobrevida e características clínicas prognósticas do Linfoma de Hodgkin em crianças. Dilly-Feldis et al. em estudo realizado na França com 42 pacientes pediátricos, também observaram baixa expressão de PD-1 (poucos pacientes apresentaram a formação de rosetas e também tiveram positividade em

torno de 1-3% dos linfócitos). Porém, a população por eles estudada apresentou expressão mais forte de PD-L1 (a molécula estava presente em mais de 50% do tecido na maior parte dos casos) e não teve associação da expressão dessas proteínas com cura e/ou recaída e refratariedade¹⁰.

Em estudos com adultos, os resultados foram diferentes dos observados neste estudo em crianças. Hollander et al. em estudo com pacientes de 15 a 86 anos na Suécia observaram que houve associação com menor sobrevida global e livre de eventos em pacientes que eram PD-1 positivos e menor sobrevida global de pacientes PD-L1 positivos, ambas as análises do tipo multivariada¹². Outros estudos em adultos e em países desenvolvidos também encontraram associação entre aumento de positividade de PD-1 e/ou PD-L1 com diminuição de sobrevida e características de pior prognóstico^{11,23,24}.

As discordâncias encontradas entre o presente estudo e os citados anteriormente podem residir no fato da população estudada ser muito diferente da nossa, com pacientes adultos, de países desenvolvidos, protocolos de tratamento distintos, predominância do subtipo histológico Esclerose Nodular (neste estudo a maior parte dos pacientes possuíam o tipo celularidade mista). Vale ressaltar que nos estudos citados anteriormente, com exceção do trabalho de Koh et al.²³, a influência da positividade do PD-1 e do PD-L1 foi significativa quando em análise multivariada na presença de outros fatores.

Devido a este aumento de PD-1 associado a diminuição da sobrevida de pacientes adultos, alguns ensaios clínicos envolvendo drogas anti-PD-1, como o nivolumab, têm sido realizados, principalmente com pacientes recaídos ou refratários. Estes estudos tem mostrado boa efetividade nesses pacientes, com perfil de segurança aceitável²⁸⁻³⁰. Em relação a estudos em crianças, foi encontrado na literatura dois relatos de casos de uso de um anti-PD-1. Em ambos os estudos, foi utilizado o nivolumab em pacientes refratários ao tratamento, sendo um deles em momento pós-transplante. Foi observada resposta

importante dos pacientes ao tratamento, com efeitos adversos inexpressivos^{31,32}. Portanto, a maior compreensão do PD-1 e PD-L1 podem ter implicações de tratamento em um futuro próximo, aumentando o arsenal terapêutico para o LH pediátrico.

CONCLUSÃO

Neste estudo, a baixa positividade do PD-1 com o aumento de positividade do PD-L1 foi associada à diminuição da sobrevida e estadiamento tardio em nossa população pediátrica. Também foi encontrada maior positividade de PD-1 e maior expressão de PD-L1, sobretudo quando este se encontra mais intenso na célula transformada do que no infiltrado inflamatório, associados a melhora na sobrevida global e livre de eventos, diminuição da ocorrência de óbito e estadiamento precoce. Com estes dados, ressaltamos a importância dessas moléculas por seu significado clínico e contribuição na patogênese do LH em crianças. Mais estudos, sobretudo em âmbito nacional e regional na população pediátrica, são necessários para compreensão mais plena dessa doença e das moléculas envolvidas em sua fisiopatologia.

REFERÊNCIAS

1. INCA. Incidência hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: Informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade [Internet]. 2017. 229 p. Available from:
<http://www1.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017/pdf/incidencia.pdf>
2. Ministério da Saúde BRASIL. A situação do câncer no Brasil [Internet]. Ações De Enfermagem Para O Controle Do Câncer. 2008. 5–32 p. Available from:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/situacao_cancer_brasil.pdf
3. INCA. Morbidade hospitalar do câncer de 2009-2011 [Internet]. 2011. p. 14. Available from: <http://www1.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017/pdf/morbidade-criancas-adolescentes-0-19-anos.pdf>
4. BARROS MHM. Linfoma De Hodgkin Na Infância E Adolescência. Um Estudo Das Características Histológicas, Clínicas, Epidemiológicas E De Associação Com O Vírus Epstein-Barr. 2007;188.
5. Marinho DF, Paiva SG, José G, Glehn V. Linfoma de Hodgkin: Relato de caso. Rev Científica do ITPAC, Araguaína, v5, n2, Pub4, Abril 2012 [Internet]. 2012;3–8. Available from: <http://www.itpac.br/arquivos/Revista/52/4.pdf>
6. Morais A. Linfoma de Hodgkin na infância. In: Oncologia, uma abordagem multidisciplinar. 2015.
7. Stefan DC. Hodgkin lymphoma in Africa: Present and future. Transfus Apher Sci [Internet]. 2013;49(2):144–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2013.07.016>
8. Nagpal P, Akl MR, Ayoub NM, Tomiyama T, Cousins T, Tai B, et al. Pediatric Hodgkin lymphoma- biomarkers, drugs, and clinical trials for translational science and medicine. Oncotarget. 2016;7(41):67551–73.

9. Pedoeem A, Azoulay-alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin Immunol* [Internet]. 2014;153(1):145–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2014.04.010>
10. Dilly-feldis M, Ducassou S, Aladjidi N, Rullier A, Refait JK, Parrens M. Expression of PD-1 / PD-L1 in children ' s classical Hodgkin lymphomas. 2019;(August 2018).
11. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1 + tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol* [Internet]. 2009;40(12):1715–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2009.03.025>
12. Hollander P, Kamper P, Smedby KE, Enblad G, Ludvigsen M, Mortensen J, et al. High proportions of PD-1⁺ and PD-L1⁺ leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. 2017;1(18):1427–39.
13. Ferreira JM de O, Klumb CE, Reis R de S, Santos M de O, Oliveira JFP, de Camargo B, et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: First report from Brazil. Vol. 36, *Cancer Epidemiology*. 2012.
14. Zubizarreta PA, Alfaro E, Gutter M, Sanchez La Rosa C, Galluzzo ML, Millán N, et al. Children and Adolescent Hodgkin Lymphoma in Argentina. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2017;39(8):1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28902084><http://Insights.ovid.com/crossref?an=00043426-900000000-98106>
15. Souza LNS, Maluf Junior PT, Almeida MTA, Weltman E, Cornacchioni AL, Teixeira RAP, et al. Linfoma de Hodgkin na infância e adolescência: 15 anos de

- experiência com o protocolo DH-II-90. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. 2010;32(4):295–302. Available from:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000400006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
16. Venkataraman G, Mirza MK, Eichenauer DA, Diehl V. Current status of prognostication in classical Hodgkin lymphoma. Br J Haematol. 2014;165(3):287–99.
 17. Matsuki E, Younes A. Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma. Semin Cancer Biol [Internet]. 2015;34:14–21. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.002>
 18. Moreira adriana helena. Detecção de vírus oncogênicos (ebv, hhv8 e sv40) em linfomas humanos e correlação com dados clinicopatológicos. 2012;
 19. Ferreira JM de O, Klumb CE, Reis R de S, Santos M de O, Oliveira JFP, de Camargo B, et al. Lymphoma subtype incidence rates in children and adolescents: First report from Brazil. Cancer Epidemiol [Internet]. 2012;36(4):e221–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2012.03.006>
 20. Dolcetti R, Dal Col J, Martorelli D, Carbone A, Klein E. Interplay among viral antigens, cellular pathways and tumor microenvironment in the pathogenesis of EBV-driven lymphomas. Semin Cancer Biol [Internet]. 2013;23(6 PA):441–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.07.005>
 21. Myriam BD, Sonia Z, Hanene S, Teheni L, Mounir T. Prognostic significance of Epstein–Barr virus (EBV) infection in Hodgkin lymphoma patients. J Infect Chemother [Internet]. 2017;23(3):121–30. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1341321X16301829>

22. Tanyildiz HG, Yildiz I, Bassullu N, Tuzuner N, Ozkan A, Apak H. The Role of Epstein-Barr Virus LMP-1 Immunohistochemical Staining in Childhood Hodgkin Lymphoma. 2015;25(6):6–10.
23. Koh YW, Jeon YK, Yoon DH, Suh C. Programmed death 1 expression in the peritumoral microenvironment is associated with a poorer prognosis in classical Hodgkin lymphoma. 2015;
24. Hematol A, Paydas S, Ba E, Seydaoglu G, Ercolak V, Ergin M. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. 2015;1.
25. Benedito M, Jo M. Linfoma de Hodgkin e Autoimunidade : Existirá uma Relação ? 2015;28(6):749–53.
26. Fallah M, Liu X, Ji J, Sundquist K, Hemminki K. Hodgkin lymphoma after autoimmune diseases by age at diagnosis and histological subtype. 2014;25(7):1397–404.
27. Ross JA, Spector LG, Grufferman S. Infectious, autoimmune, and allergic diseases and risk of Hodgkin lymphoma in children and adolescents: A Children’s Oncology Group (COG) study. *Int J Cancer*. 2015;135(6):1454–69.
28. Evazi AAMR, Roozbeh MSN, Ghorbani MGM, Darvish JAL. Efficacy of nivolumab as checkpoint inhibitor drug on survival rate of patients with relapsed / refractory classical Hodgkin lymphoma : a meta - analysis of prospective clinical study. *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2019;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s12094-018-02032-4>
29. H. Beköz, N. Karadurmuş, S. Paydaş, A. Türker, T. Toptaş, T. Fıratlı Tuğlular, M. Sönmeç, Z. Gülbaş, E. Tekgündüz, A. H. Kaya, M.Özbalak, N. Taştemir, L. Kaynar, R. Yıldırım, İ. Karadoğan, M. Arat, F. Pepedil Tanrıku, V.

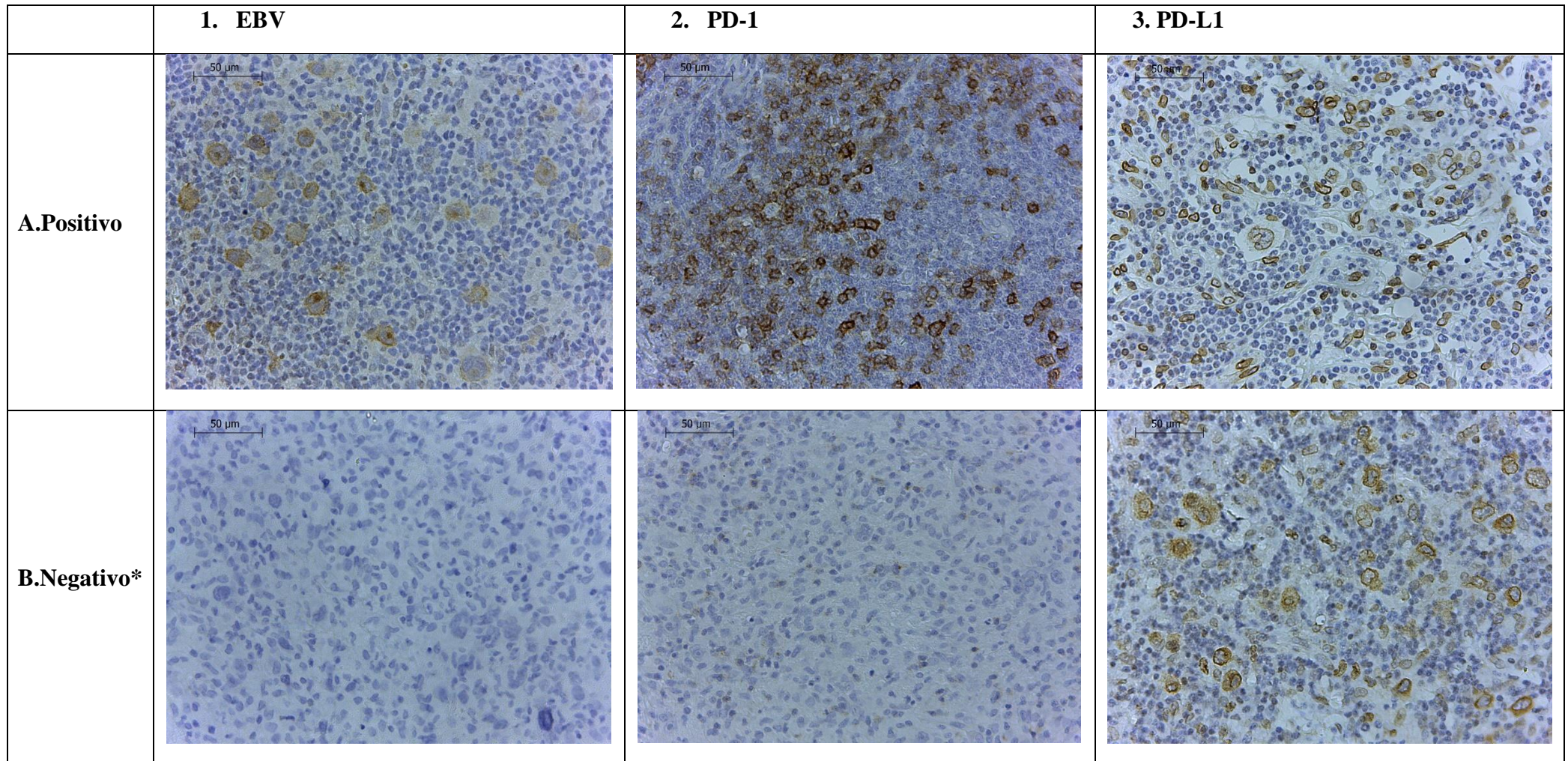
- Özkocaman, H. Abalı, M. Turgut and BF. Nivolumab for relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: real-life experience Short. *Ann Oncol.* 2017;28(10):2496–502.
30. Access HP, 22. A manuscript NEJMA manuscript; available in P 2015 J, Stephen M. Ansell, Alexander M. Lesokhin, Ivan Borrello, Ahmad Halwani, Emma C. Scott, Martin Gutierrez, Stephen J. Schuster, Michael M. Millenson, Deepika Cattray, Gordon J. Freeman, Scott J. Rodig, Bjoern Chapuy, Azra H. Ligon, Lili Zhu, M.S., Joseph F. and PA. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin’s Lymphoma. *N Engl J Med.* 2015;372(4):311–9.
31. Foran AE, Nadel HR, Lee AF, Savage KJ, Deyell RJ. Nivolumab in the Treatment of Refractory Pediatric Hodgkin Lymphoma. 2016;00(00):1–4.
32. Shad AT, Esposito G, Symons HJ, Huo JS, Chen AR, Darcy C, et al. Tolerance and effectiveness of nivolumab after pediatric T-cell replete , haploidentical , bone marrow transplantation : A case report. 2016;(May):1–4.

ANEXOS

Tabela 1. Características clínico-demográficas, radiológicas, laboratoriais, de imunohistoquímica e de tratamento das crianças com Linfoma de Hodgkin.

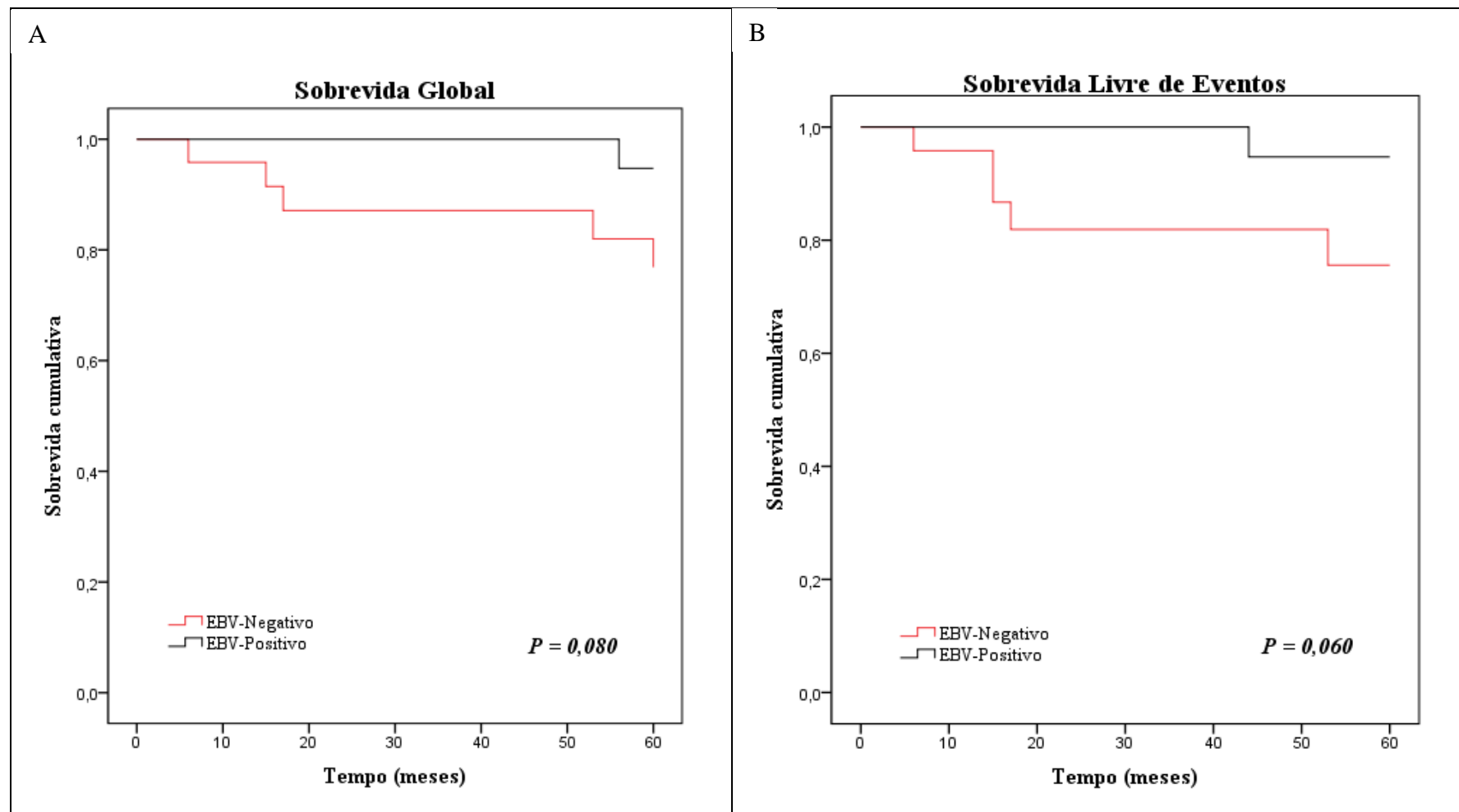
Característica	Cura (n=34)	Desfecho desfavorável (n=15)	Total (n=49)
Gênero			
Masculino	24 (70,6%)	10 (66,7%)	34 (69,4%)
Feminino	10 (29,4%)	5 (33,3%)	15 (30,6%)
Idade	10,9 anos	9,9 anos	10,5 anos
Variáveis laboratoriais			
Hemoglobina < 10,5	10 (29,4%)	9 (60,0%)	19 (38,8%)
VSH > 20	19 (55,9%)	10 (76,9%)	29 (67,4%)
DHL > 270	11 (32,4%)	2 (13,3)	19 (38,7%)
Variáveis Clínicas			
Bulk disease mediastinal	9 (26,5%)	5 (33,3%)	14 (28,6%)
Sintomas B	8 (23,5%)	9 (60%)	17 (34,7%)
Diagnóstico histológico			
Esclerose Nodular	13 (38,2%)	2 (13,3%)	15 (30,6%)
Celularidade Mista	11 (32,4%)	9 (60,0%)	20 (40,8%)
Outros	10 (29,4%)	4 (26,7%)	14 (28,6%)
Imunohistoquímica diagnóstica			
CD15	28 (82,4%)	11 (73,3%)	39 (79,6%)
CD30	30 (88,2%)	13 (86,7%)	43 (87,8%)
CD20	7 (20,6%)	3 (20%)	10 (20,4%)
Estadiamento			
Estadio precoce	25 (73,5%)	5 (33,3%)	30 (61,2%)
Estadio tardio	9 (26,5%)	10 (66,7%)	19 (38,8%)
Protocolo			
SJCRH 1980	-	1 (6,7%)	1 (2%)
HOD-94	17 (50,0%)	6 (40%)	23 (46,9%)
HOD-08	17 (50,0%)	5 (33,3%)	22 (44,9%)
ABVD	-	3 (20%)	3 (6,1%)
Resposta completa	21 (61,8%)	9 (60%)	30 (61,2%)
Desfecho			
Cura	34 (100,0%)	-	34 (69,4%)
Desfecho desfavorável (óbito+cura)	-	15 (100,0%)	15 (30,6%)
Óbito	-	6 (40,0%)	6 (12,2%)
Recaída	-	12 (80,0%)	12 (24,5%)

Figura 1. Detecção de EBV e expressão de PD-1 e PD-L1 em pacientes infanto-juvenis com Linfoma de Hodgkin.



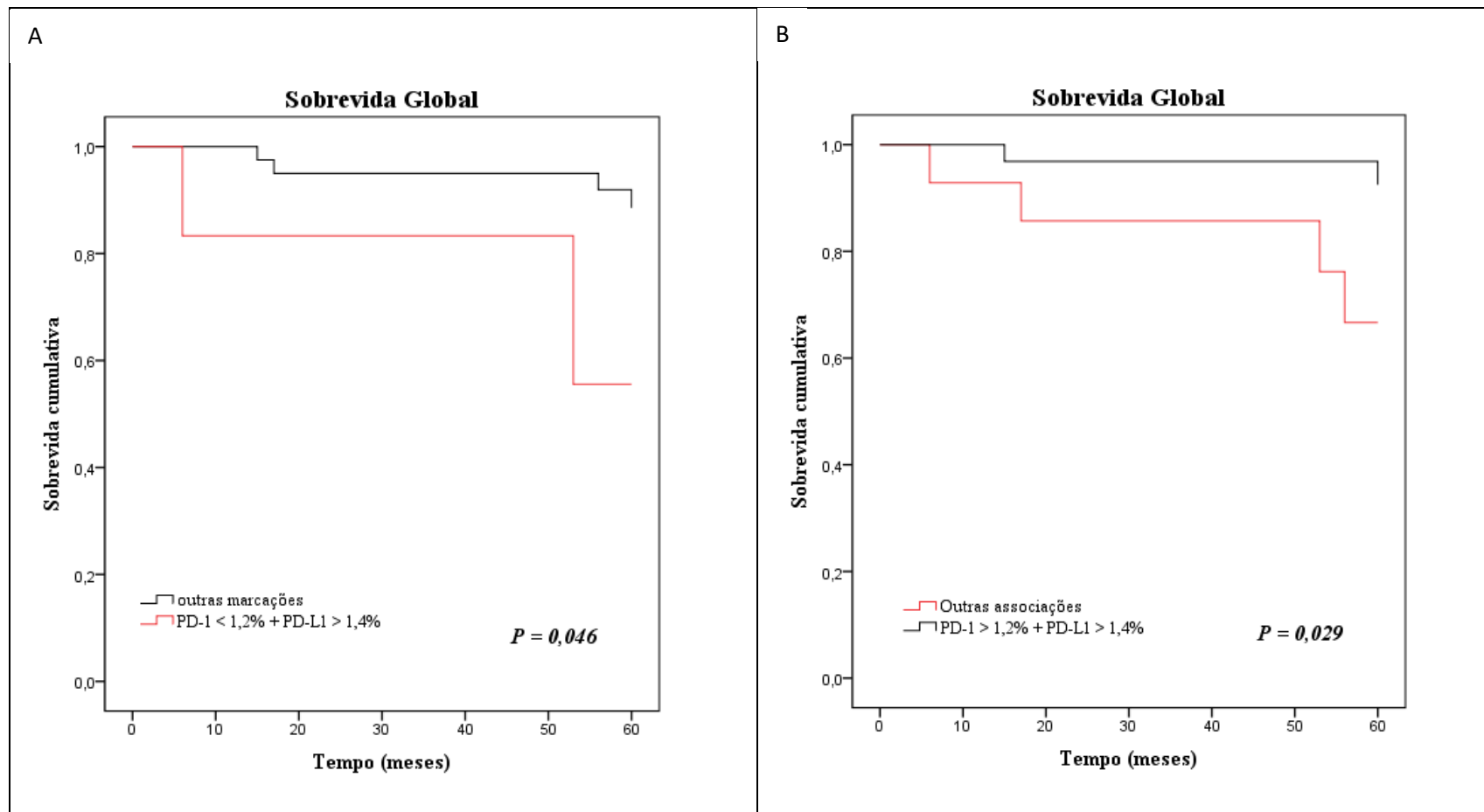
1A. Paciente EBV positivo; **1B.** Paciente EBV negativo; **2A.** Paciente PD-1 positivo por formação de roseta; **2B.** Paciente PD-1 negativo; **3A.** Paciente PD-L1 positivo com aumento de expressão em célula maligna em relação a infiltrado inflamatório; **3B.*** Paciente PD-L1 positivo com célula maligna e infiltrado inflamatório com expressão semelhante. Optamos por colocar esta marcação ao invés da negativa para caracterizar a análise qualitativa.

Figura 2. Associação da Sobrevida com a presença do EBV.



A. Diminuição da Sobrevida Global associada a negatividade para EBV, ; **B.** Diminuição da Sobrevida Livre de Eventos associada à negatividade para EBV.

Figura 3. Análise de Sobrevida Global associada a expressão de PD-1 e PD-L1 de pacientes infanto-juvenis com Linfoma de Hodgkin.



A. Sobrevida global dos pacientes com PD-1 < 1,2% + PD-L1 > 1,4%; **B.** Sobrevida global dos pacientes com PD-1 > 1,2% + PD-L1 > 1,4%.

Figura 4. Sobrevida Livre de Eventos dos pacientes com PD-1>1,2% + PD-L1 mais intenso na célula transformada.

