



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

Análise quantitativa do DNA circulante nos linfomas não Hodgkin:
Impacto no diagnóstico, na avaliação da resposta ao tratamento, e no
prognóstico

Alex Sandro Correa Machado

Rio de Janeiro

Outubro, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Análise quantitativa do DNA circulante nos linfomas não Hodgkin:
Impacto no diagnóstico, na avaliação da resposta ao tratamento, e no
prognóstico

Alex Sandro Correa Machado

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários á obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Orientadora: Claudete Esteves Nogueira Pinto Klumb

Rio de Janeiro

Outubro, 2009

Machado, Alex Sandro Correa

Análise quantitativa do DNA circulante nos linfomas não Hodgkin: Impacto no diagnóstico, na avaliação da resposta ao tratamento, e no prognóstico/ Alex Sandro Correa Machado – Rio de Janeiro:UFRJ/IBqM, 2009. xiv, 115 f. 14il.

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/Instituto de Bioquímica Médica/Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, 2009.

Orientadora: Claudete E. N. Pinto Klumb

Referências Bibliográficas: f. 88-101

1. DNA circulante. 2. Carva viral EBV. 3. PCR em tempo real. 4. Linfoma Não Hodgkin. I. Claudete E. N. Pinto Klumb. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-graduação em Química Biológica. IV. Título.

Análise quantitativa do DNA circulante nos linfomas não Hodgkin: impacto no diagnóstico, na avaliação da resposta ao tratamento, e no prognóstico

Alex Sandro Correa Machado

Orientadora: Claudete Esteves N. Pinto Klumb

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química Biológica.

Aprovada em 27 de outubro de 2009 por:

Orientadora: Dr^a Claudete Esteves Nogueira Pinto Klumb

Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer

Dr^a Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer

Dr^a Claudia Esther Alicia Rocio Hassan

Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer

Dr. Claudio Akio Massuda

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Revisor/Suplente Interno: Dr^a Marcos Henrique Ferreira Sorgine

Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Revisora/ Suplente Externo: Dr^a Karina Lani Silva

Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer

Aos meus avós Octacílo
e Wanda (*em memória*)

AGRADECIMENTOS

À Deus, que com seu imenso amor, é presença viva e constante em todos momentos da minha vida.

À minha família, parte eterna de mim e base de todo meu sucesso! Aos meus pais Japuranan e Iara e, minha irmã Alessandra. Agradeço por amor e carinho dedicado ao longo da minha vida.

Aos meus avós (Otacílio e Wanda, Darcy e Arlene), pelo exemplo de sabedoria e persistência.

À minha segunda família, Maria Anita e Camilo (sogros), Carol e Camila (cunhadas), os quais agradeço por toda força dedicada nesses 8 anos de convivência (espero contar com vocês por 80 anos....)

Aos meus amigos, Moacyr, Rafael e Fernanda, Juninho, Alexandre, Samantha Pedro Duque, Flaviana e Eliane. Muito obrigado por serem luz no meu caminho!

Aos amigos do Laboratório Hematologia Celular e Molecular, pelas discussões científicas (às vezes menos científicas) que contribuíram para meu crescimento como pesquisador. Em especial: à Dr^a Raquel Maia, pelo acolhimento no laboratório e comentários sempre pertinentes a este trabalho; Aos Staffs: Marcos, Jolie e Flávia e, Também a Dr^a Karina Lani, por ter aceitado o convite para fazer a revisão da dissertação.

À Marcela Robaina, minha “ex-aluna de IC”, pela ajuda nos experimentos e a santa paciência de me aturar.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Câncer (UFRJ), onde realizei os primeiros experimentos de quantificação viral desta dissertação. Em especial ao Prof. Franklin Rumjaneck, por ter cedido o laboratório bem como todas as condições necessárias para a realização dos experimentos.

Além disso, pelos conselhos acrescentados a este trabalho, e também, durante a realização do crédito didático.

À Nívea Amoêdo, principal responsável pelos motivos que levaram a realização deste trabalho: a amizade, o fato de ter me indicado à Dr^a Claudete e ter me ensinado os primeiros passos no PCR em tempo real. Só posso lhe dizer Muito Obrigado!

Ao professor Marcos Sorgine, pela revisão da dissertação e opiniões relevantes que levaram ao aperfeiçoamento deste trabalho.

À Dr^a Claudete Klumb, pela orientação, amizade, paciência e cuidado comigo. Tenho certeza que esta dissertação representa o quanto valeu a pena seus ensinamentos.

À minha esposa Maria Clara, pela paciência e compreensão nos momentos que estive ausente durante a elaboração deste trabalho. Muito obrigado pela sua capacidade de me ressuscitar todos os dias com seu olhar e palavras!

Valeu!

RESUMO

A presença de DNA circulante no plasma ou soro de pacientes com câncer foi demonstrada pela primeira vez na década de 70. Desde então, a quantificação do DNA tumoral tem sido investigada no plasma de pacientes com neoplasias. Diferentes estudos têm relatado que a concentração de DNA circulante encontra-se elevada nos pacientes com câncer quando comparada com a de indivíduos saudáveis. Em neoplasias associadas com o vírus Epstein-Barr (EBV) as células tumorais podem liberar DNA não encapsulado do vírus para o plasma através de apoptose, ou necrose. Esta característica também vem sendo alvo de estudos no monitoramento e avaliação prognóstica. O EBV está associado à patogênese de diversos linfomas não Hodgkin originados de células linfóides B (LNH-B) e, dentre eles, o linfoma de Burkitt (LB). No Brasil, a frequência de associação do EBV com o LB é alta e varia de 50 a 87% nos casos de LB pediátricos, e de 71% dos linfomas associados ao HIV (LNH-AIDS). Apesar dos excelentes resultados obtidos em crianças com LNH-B com a utilização de regimes intensivos de quimioterapia, existe um subgrupo de pacientes que não responde ao tratamento. Estes pacientes possuem fatores de prognóstico de alto risco como níveis elevados da LDH e estágios avançados. Para o LNH-AIDS, os estágios (III e IV) e IPI com *score* 2 e 3 conferem pior prognóstico afetando a resposta ao tratamento. O objetivo deste estudo foi analisar quantitativamente o DNA do EBV circulante no plasma como um marcador de diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento em pacientes com LNH-B. Para isso foram analisadas amostras de plasma de 42 pacientes com LNH-AIDS e 29 pacientes com LNH pediátricos. Como controles foram incluídos 20 indivíduos saudáveis. O DNA total e do EBV (na série pediátrica) e EBV na série LNH-AIDS, foi quantificado por QPCR, utilizando conjuntos de iniciadores e sondas desenhados especificamente para as regiões do gene da β -globina (genoma humano) e *EBNA-1* presente no genoma viral. As concentrações de DNA total e do EBV no plasma dos pacientes com LNH-B pediátrico foram obtidas ao diagnóstico, durante e ao término do tratamento. Ao diagnóstico, as concentrações do DNA total no plasma de pacientes e controles variaram de 35 a 190185 cópias/mL, e de 12 a 151 cópias/mL, respectivamente. Quanto à detecção do EBV, foi observada uma correlação de 100% entre o diagnóstico do vírus no tumor por hibridização *in situ* (padrão ouro) e a detecção do EBV no plasma. A carga viral dos pacientes ao diagnóstico variou entre 23 a 3436 cópias/mL (mediana=1258 cópias/mL). Os indivíduos controles apresentaram carga viral negativa. Pacientes que responderam ao tratamento tiveram queda do número de cópias de ambos os alvos logo após o primeiro ciclo de quimioterapia, com níveis de DNA permanecendo indetectáveis ou baixos até o término do tratamento. Por outro lado, pacientes refratários apresentaram um aumento significativo do DNA total, ou viral. Em pacientes com LNH-AIDS a presença do EBV no plasma ao diagnóstico não foi um fator indicativo de mau prognóstico. Entretanto, foi demonstrado que os níveis elevados, acima da mediana (1300 cópias/mL) estavam associados com redução da sobrevida global. Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo indicam que o DNA circulante pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da resposta ao tratamento dos pacientes com LNH-B.

ABSTRACT

The presence of circulating DNA in plasma or serum of cancer patients was first demonstrated in the 70's. Since then, DNA quantification has been investigated in the plasma of cancer patients. Different studies have reported that the concentration of circulating DNA is higher in cancer patients as compared with healthy subjects. In cancers associated with Epstein-Barr virus (EBV), tumor cells can release not encapsulated DNA virus to the plasma through apoptosis or necrosis. This feature has also been the focus of studies on monitoring treatment response, and for prognostic evaluation. EBV is associated with the pathogenesis of B cell non-Hodgkin's lymphomas (B-NHL), and among them, Burkitt's lymphoma (BL). In Brazil, the frequency of EBV association with BL is high ranging from 50 to 87% in pediatric cases, and 71 % of HIV-associated lymphomas (AIDS-NHL). Despite the excellent results obtained with the use of intensive chemotherapy regimens in pediatric NHL, there is a subgroup of patients which do not present response to treatment. These patients have at diagnosis high risk prognostic factors such as high levels of LDH and advanced stages. For the NHL-AIDS lymphomas these factors are advanced disease stages (III and IV) and IPI score 2 and 3. The objective of this study was to quantify circulating EBV DNA in plasma as a marker of prognosis and treatment response in patients with B-NHL. To this end, plasma samples from 42 patients with NHL associated with HIV and 29 patients with pediatric B-NHL were analyzed. Moreover, 20 healthy subjects were included as controls. After extraction of DNA from plasma, the total DNA and EBV-DNA (in pediatric series) and EBV-DNA (in AIDS-NHL) series were quantified by QPCR, using sets of primers and probes designed specifically for regions of β -globin gene (human genome) and EBNA-1 gene present in the viral genome. Total DNA and EBV concentrations in the plasma of pediatric B-NHL patients were analyzed at diagnosis, during, and at the end of treatment. In these patients the concentration of total DNA in plasma of patients and controls ranged from 35 to 190,185 copies/mL, and 12 to 151 copies/mL, respectively. We observed a 100% of correlation between the diagnosis of virus in the tumor by in situ hybridization (gold standard method) and the detection of EBV in plasma. The viral load of patients at diagnosis ranged from 23 to 3436 copies/mL (median=1258 copies/mL). The control subjects had negative-viral load. Interestingly, we observed that patients who responded to treatment had a decrease of DNA levels for both targets after the first chemotherapy cycle, with levels of DNA remaining undetectable or low until the end of treatment. On the other hand, patients with progressive disease had a significant increase of total or viral DNA plasma levels. Besides, in AIDS-NHL patients, plasma EBV-DNA levels higher than the median value (1300 copies/mL) were associated with an inferior overall survival. Together, the results of this study indicate that the circulating DNA may be a useful tool at diagnosis and for monitoring treatment response in B-NHL patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
Figura 1	Presença de DNA circulante em diferentes fluídos corporais	3
Figura 2	Diferentes tipos de fragmentação do DNA purificado do plasma	5
Figura 3	Mecanismos de liberação de DNA circulante por células tumorais	8
Figura 4	Detecção do EBV por PCR	52
Figura 5	Curva padrão relacionando o número de cópias das cinco ordens de grandeza em relação aos seus respectivos CT	54
Figura 6	Comparação inter-ensaio das curvas padrões	55
Figura 7	Detecção do EBV em amostras tumorais de pacientes com LNH-B, utilizando a metodologia de hibridização <i>in situ</i>	56
Figura 8	Monitoramento da carga viral em pacientes com LNH-B associado ao EBV durante o tratamento	60
Figura 9	Perfil de paciente com LNH-B associado ao EBV que apresentou recidiva durante tratamento	61
Figura 10	Quantificação do DNA total no plasma dos pacientes LNH-B	64
Figura 11	Análise da sensibilidade e especificidade da quantificação do DNA circulante total	65
Figura 12	Monitoramento do DNA total no plasma durante o tratamento de pacientes com LNH-B	67
Figura 13	Monitoramento do DNA total durante o tratamento no plasma de pacientes com LNH-B	68
Figura 14	Quantificação do EBV ao diagnóstico no plasma de pacientes com LNH-B, LNH-AIDS e controles	70
Figura 15	Curvas de Kaplan-Meier para avaliação da probabilidade de sobrevida dos pacientes LNH-AIDS	73

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Pág.
Tabela 1	Abordagens aplicadas na detecção e quantificação do DNA circulante.	11
Tabela 2	Padrões de latência em diferentes doenças linfoproliferativas	22
Tabela 3	Categoria dos Linfomas associados ao HIV (OMS)	33
Tabela 4	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores	45
Tabela 5	Características clínicas e biológicas dos pacientes pediátricos e adultos jovens com LNH-B	49
Tabela 6	Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-AIDS	51
Tabela 7	Comparação dos métodos de detecção do EBV por ISH e PCR em tempo real	57
Tabela 8	Quantificação do DNA total e do EBV por QPCR no plasma	62
Tabela 9	Quantificação do EBV por QPCR no plasma dos pacientes com LNH-AIDS	69

LISTA DE ABREVIATURAS

mL	mililitro
mM	milimolar
g	gramas
ng	nanograma
°C	graus centígrados
µg	micrograma
µL	microlitro
ANC	Ácidos nucleicos circulantes
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CNF	Carcinoma de nasofaringe
CT	Ciclo <i>Threshold</i> (Limiar)
DLP	Doenças linfoproliferativas
DLPT	Doenças linfoproliferativas pós transplante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatado
β - Globina	Beta globina
EBNA-1	<i>Epstein-Barr Nuclear Antigen-1</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (hibridização <i>in situ</i> fluorescente)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HAART	Terapia antirretroviral ativa
HC-1	Hospital do Câncer 1
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Herpes vírus

INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPI	Índice de prognóstico internacional
ISH	<i>In situ Hybridization</i> (Hibridização <i>in situ</i>)
KCL	Cloreto de potássio
K-ras	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral</i>
LB	Linfoma de Burkitt
LC	Linfoma centrolástico
LCA	Antígeno comum de leucócitos
LDGC-B	Linfoma difuso de grandes células de origem B
LDH	Enzima desidrogenase láctica
LH	Linfoma de Hodgkin
LI	Linfoma imunoblástico
LNH	Linfoma não Hodgkin
LNH-AIDS	Linfoma não Hodgkin associado ao HIV
LNH-B	Linfoma não Hodgkin de origem B
LOH	Perda de heterozigosidade
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MGMT	<i>O6-methylguanine–DNA methyltransferase</i>
PSA	Antígeno prostático específico
pSG	Probabilidade de sobrevivência global
QPCR	Reação de cadeia polimerase em tempo real
QT	Quimioterapia
RARβ2	<i>Retinoic acid receptor B2</i> (Receptor B2 do ácido retinóico)
RASSF1A	<i>Ras ASSociation domain Family 1A</i>
TdT	<i>Terminal Dioxinucleotidil Transferase</i>
Tris-HCl	Hidroximetil, ácido clorídrico
UCHL-1	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1</i>

ASA-PCR Reação de cadeia em polimerase alelo específico
MSP-PCR Reação de cadeia em polimerase metilação específico
SSCP polimorfismo de conformação de fita simples
RFLP *restriction fragment length polymorphism*

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 DNA circulante	1
1.1.1 Origem e características do DNA livre no plasma	1
1.1.2 Detecção e quantificação do DNA circulante em condições patológicas	9
1.1.3 Identificação de alterações moleculares no DNA circulante	12
1.1.3.1 Mutações	12
1.1.3.2 Regiões microsatélites	13
1.1.3.3 Modificações epigenéticas	13
1.1.3.4 Infecções virais	14
1.1.4 Quantificação do DNA circulante em doenças não neoplásicas	15
1.1.5 Quantificação do DNA no plasma em neoplasias	17
1.1.6 DNA circulante em neoplasias associadas ao vírus Epstein-Barr	21
1.2 Linfomas não Hodgkin	27
1.2.1 Linfoma de Burkitt	27
1.2.2 Linfomas não Hodgkin associados ao HIV	32
2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral	36
2.1 Objetivos específicos	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Seleção de Pacientes e controles	37

3.1.1	Seleção dos pacientes com LNH-B	37
3.1.2	Seleção dos pacientes com LNH-AIDS	38
3.1.3	Seleção dos controles	39
3.2	Avaliação histopatológica das amostras tumorais	39
3.2.1	Preparo das amostras tumorais e diagnóstico histopatológico	39
3.2.2	Detecção do EBV	40
3.3	Análise quantitativa do DNA livre no plasma dos pacientes e controles	41
3.3.1	Coleta e armazenamento das amostras de plasma	41
3.3.2	Extração de DNA	41
3.3.3	Reação de Cadeia em Polimerase (PCR)	42
3.4	PCR em tempo real (QPCR)	43
3.5	Análise Estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-B	48
4.1.1	Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-B pediátricos	48
4.1.2	Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-AIDS	50
4.2	Padronização da detecção e quantificação do DNA circulante no plasma dos pacientes com LNH-B	52
4.2.1	Extração do DNA circulante em pacientes e controles	52
4.2.2	Padronização da curva padrão para ensaio quantitativo por PCR em tempo real	53
4.3	Detecção do EBV no plasma e no tumor dos pacientes com LNH-B pediátricos	56
4.3.1	Comparação entre a detecção do EBV no plasma e em amostras tumorais	56
4.3.2	Quantificação da carga viral do EBV no plasma	57

4.3.3	Relação entre a concentração do DNA e o nível de LDH	57
4.3.4	Quantificação do DNA do EBV plasma durante o tratamento	58
4.3.5	Quantificação de β -globina na avaliação do DNA total no plasma de pacientes com LNH-B pediátricos	62
4.3.6	Análise da especificidade e sensibilidade da quantificação do DNA total	65
4.3.7	Quantificação do DNA total livre no plasma durante o tratamento	66
4.4	Detecção e quantificação do DNA do EBV no plasma dos pacientes com LNH associados ao HIV	69
4.4.1	Comparação entre os níveis de DNA do EBV no plasma dos pacientes com LNH-B imunocompetentes e LNH-AIDS	70
4.4.2	Impacto das variáveis clínicas e biológicas no prognóstico de pacientes com LNH-AIDS	71
5	DISCUSSÃO	74
6	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	ANEXOS	
	ANEXO 1	105
	ANEXO 2	106
	ANEXO 3	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 DNA CIRCULANTE

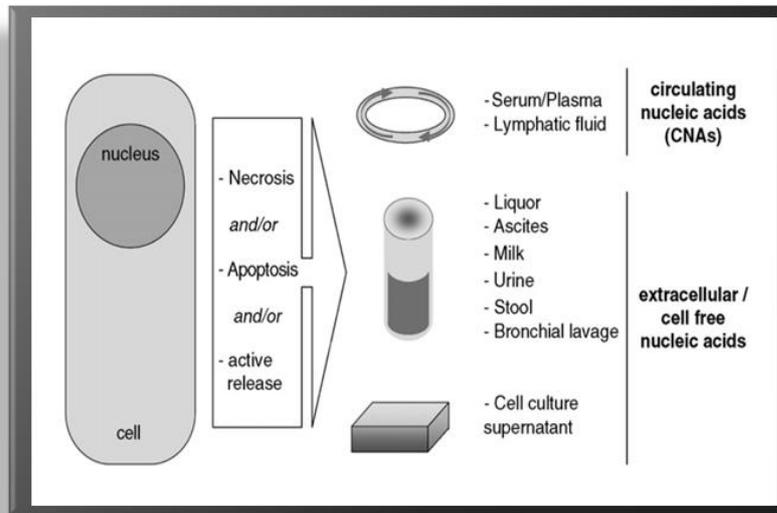
1.1.1 Origem e características do DNA livre no plasma

A presença de ácidos nucleicos circulantes (ANC) foi observada pela primeira vez em 1948 no plasma de indivíduos saudáveis e portadores de diferentes patologias. Além do plasma e soro, os ANC podem ser encontrados fora da célula em outros fluídos corporais como urina, liquor e saliva, além de serem originados de células de diferentes tecidos entre eles: tecido hematopoiético, sistema nervoso central, embrionário e células tumorais. Os ANC também podem ter origem exógena como por exemplo, viral e bacteriana (MANDEL *et al*, 1948 ; GOESSL *et al*, 2002 ; FLEISCHHACKER *et al*, 2007).

Lui e colaboradores (2002; 2003) quando utilizaram como modelo pacientes transplantados com medula óssea provenientes de doadores de sexo oposto, observaram uma predominância de DNA circulante derivado do sistema hematopoiético no plasma desses pacientes. Em seguida, os mesmos autores mostraram que diferentes órgãos como coração, fígado e rins podem contribuir liberando DNA para o plasma. Há relatos de que fragmentos de DNA de origem fetal ou placentária são encontrados no plasma materno durante toda gestação podendo persistir circulando na mãe meses após o nascimento (LAMBERT *et al*, 2002; LO *et al*, 1997). No câncer, acredita-se que o DNA circulante no plasma de pacientes com diferentes neoplasias é originário de células tumorais, uma vez que

este apresenta características presentes em células do tumor como mutações e metilação de genes que participam no controle da proliferação celular. Além disso, há evidências de DNA de origem não tumoral no plasma desses pacientes, sendo esses originados de células normais localizadas ao redor do tecido tumoral e que morrem devido ao crescimento do tumor (SORENSEN, 1994; JAHR, 2001; DELIGEZER, 2003).

Leon e colaboradores foram os primeiros a mostrar que a concentração de DNA circulante varia de acordo com a condição fisiológica e, ou patogênica do indivíduo. A concentração de DNA no plasma de um indivíduo saudável varia entre 10 a 100 ng. No entanto, valores até dez vezes maiores podem ser encontrados em pacientes com câncer de pulmão, anemia falciforme e pacientes com algum trauma que provoque injúria celular (LEON *et al*, 1977; FLEISCHHACKER *et al*, 2007; VASAVDA *et al*, 2007; YOON *et al*, 2009). No entanto, os mecanismos que atuam na liberação do DNA circulante não estão bem estabelecidos e envolvem diferentes tipos de morte celular (necrose, apoptose e lise), como também, a liberação espontânea de ácidos nucleicos por células viáveis (SWARUP *et al*, 2007) (Figura.1).



Fleishhcker & Schmidt 2007

Figura 1 - Presença de DNA circulante em diferentes fluídos corporais. Os ANC podem ser liberados em diferentes fluídos corporais e cultura de células por mecanismos de morte celular, ou pela liberação espontânea durante a divisão celular. Adaptado de *Fleishhcker & Schmidt, 2007*.

O DNA circulante apresenta características estruturais heterogêneas podendo ser encontrado no plasma sob a forma de fragmentos nucleossomais, ou seja, associado a histonas, ou livres dessas proteínas. Esses fragmentos variam entre 180 a 1000 pb (pares de bases). Em indivíduos saudáveis tem sido descrito um padrão de *ladder* de DNA com o predomínio de fragmentos de peso molecular menores que 500 pb, sugerindo que neste caso, o principal mecanismo de liberação nesses indivíduos é um tipo de morte celular denominada apoptose (SUZUKI *et al*, 2008; CHAN *et al*, 2003) (Figura 2). A apoptose é um importante mecanismo fisiológico pelo qual células são eliminadas nos seres vivos. Durante o processo apoptótico, a célula apresenta características marcantes, tais como, a retração celular, perda da aderência com a matriz extracelular e com as células

vizinhas, condensação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e fragmentação internucleossomal do DNA variando entre 50 e 200 pb. Há evidências da presença de corpos apoptóticos contendo DNA e RNA de origem fetal no plasma de gestantes, logo nos primeiros meses da gestação. Este resultado sugere que a apoptose está envolvida com o DNA circulante nessas mulheres, uma vez que a apoptose é o tipo de morte celular mais comum nos primeiros estágios da embriogênese. Paradoxalmente, a necrose é um evento de morte celular caracterizado pela ruptura celular. Durante a necrose todo o conteúdo celular é liberado, inclusive ácidos nucléicos, gerando fragmentos de DNA com alto peso molecular (> que 10000 pb) (NAGATA, 2000; SUZUKI *et al*, 2008; JAHR *et al*, 2001; BISCHOFF *et al*, 2005).

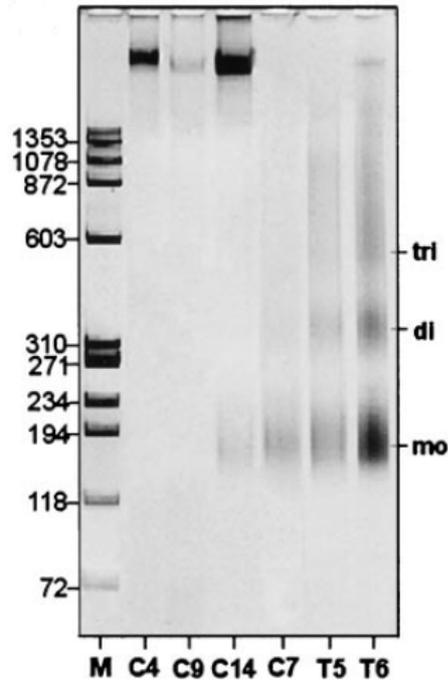


Figura 2 - Diferentes tipos de fragmentação do DNA purificado do plasma. Resultados de seis pacientes com câncer. Pacientes C7, T5 e T6 apresentam fragmentação internucleossomal do DNA sugerindo um perfil apoptótico. Os pacientes C4, C9 e C14 possuem fragmentação de alto peso molecular típica de morte celular por necrose. Adaptado de Jahr *et al*, 2001.

Jahr e colaboradores (2001) recentemente observaram tanto fragmentação oligonucleossomal, característica de apoptose, quanto fragmentos de alto peso molecular a partir de 10000 pb no plasma de pacientes com neoplasias. Ainda neste estudo, Foi observado que células da linhagem Jurkat originadas de leucemia de linfócitos T, em meio de cultura, liberam DNA característico de apoptose e necrose para o meio de cultura após 2 horas de incubação. Este resultado sugere então que no câncer, ambos, apoptose e, ou necrose contribuem para o aumento da concentração de DNA circulante no plasma (Figura 2). Contudo, parece controversa a real participação da necrose como um mecanismo que aumente a concentração de DNA no plasma. Tal fato pode ser explicado quando pacientes com tumores metastáticos são submetidos à tratamento com radioterapia, que induz morte celular por necrose. Logo após o tratamento com radioterapia tem sido observada uma diminuição de 90% na concentração de DNA. Deste modo, parece contraditória a contribuição da necrose no aumento da concentração de DNA no plasma de pacientes com neoplasias. Adicionalmente, a lise de células tumorais não metastáticas que se desprendem do tumor, também tem sido mostrada como uma fonte de liberação de DNA para o plasma (GORMALLY *et al*, 2001; LEON *et al*, 1977).

Outros mecanismos adicionais não relacionados à morte celular têm sido relatados na literatura. Stroun e colaboradores observaram *in vitro*, o DNA liberado no meio de cultura por células derivadas da linhagem de leucemia humana HL-60 quando tratadas com z-Vad ou staurosporina, um inibidor e indutor

da apoptose, respectivamente. Esse DNA apresentava um padrão de fragmentação apoptótica, sugerindo um mecanismo alternativo de liberação de DNA circulante de maneira espontânea por células vivas em divisão (STROUN *et al*, 2001). Essa evidência tem sustentado uma hipótese denominada genometástase, na qual se acredita que células tumorais em divisão liberam DNA circulante para o plasma. O DNA carregando as mesmas características genéticas geralmente encontradas nessas células, como mutações e metilações gênicas, agiria como um “oncovírus”, transformando células normais em células com características metastáticas (CHEN *et al*, 2005). Além desse mecanismo, há relatos da presença de DNA circulante complexado a proteínas ligadoras de DNA na superfície de linfócitos no plasma de indivíduos saudáveis, e em pacientes com câncer de mama. Entretanto, tais estudos são pouco conclusivos (SKVORTSSOVA *et al*, 2006; TAMKOVICH *et al*, 2005). A figura 3 mostra os diferentes mecanismos pelos quais as células tumorais podem liberar DNA para plasma ou soro.

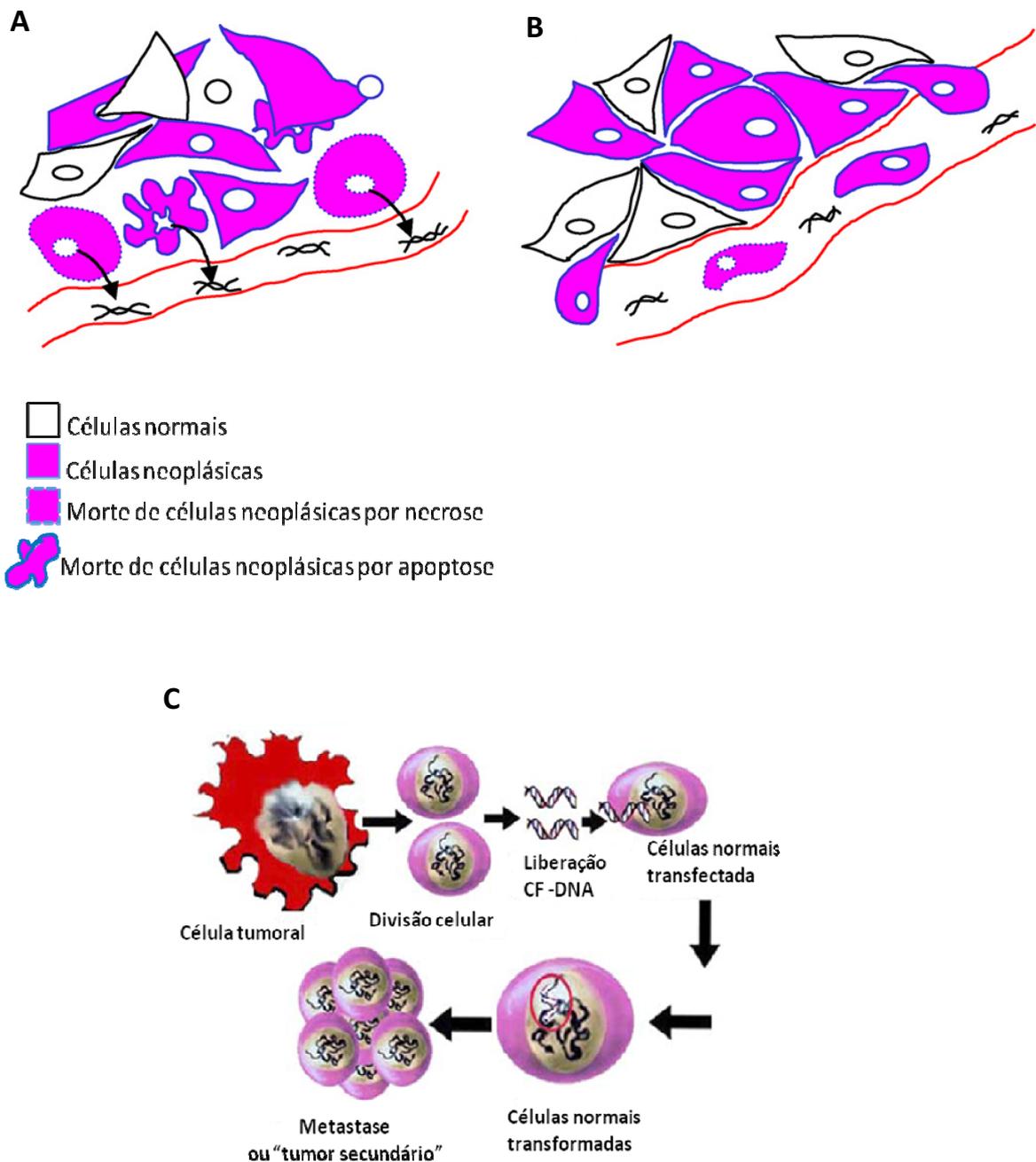


Figura 3 - Mecanismos de liberação de DNA circulante (CF-DNA) por células tumorais. (A) Células neoplásicas em necrose e/ou apoptose liberam DNA para o plasma. **(B)** Lise de células tumorais que se desprenderam do tumor e ganharam a corrente sanguínea. **(C)** Hipótese da genometástase: Liberação de DNA circulante por células tumorais em divisão. Figuras A e B adaptadas de Gormally *et al*, 2001. Figura C, adaptada de Chen *et al*, 2005.

1.1.2 Detecção e quantificação do DNA circulante em condições patológicas

O DNA circulante, como abordado anteriormente, carrega informações genéticas idênticas às células que lhe deram origem. Embora os mecanismos pelos quais o DNA originado das células tumorais entra na corrente sanguínea não estejam totalmente elucidados, há aproximadamente 60 anos sabe-se que indivíduos saudáveis possuem baixas concentrações de DNA circulante no plasma em relação a pacientes com câncer (LEON *et al*, 1977). Este achado prévio tem contribuído para crescimento da aplicação clínica do DNA circulante como um biomarcador não invasivo de prognóstico e diagnóstico, não só de neoplasias, mas também de doenças não neoplásicas, e até mesmo de origem fetal (GAHAN *et al*, 2008; YOON *et al*, 2009).

Muitos ensaios, com diferentes graus de sensibilidade, são aplicados para a detecção e quantificação do DNA circulante, incluindo ensaios radio-imunológicos, espectrofotometria, métodos fluorimétricos PicoGreen ou SYBR Green, e reação em cadeia da polimerase em tempo real (QPCR). Atualmente, em função pela sua capacidade de identificar e quantificar diferentes características presentes na molécula de DNA, mesmo em baixas concentrações, o QPCR tem sido utilizado em diversos estudos sobre o DNA circulante (FLEISCHHACKER *et al*, 2007).

Além do QPCR, outras abordagens têm sido utilizadas em diversos estudos para detecção e quantificação de marcadores específicos no DNA circulante de origem tumoral como a pesquisa de alterações genéticas e epigenéticas, ou marcadores não específicos que avaliam a quantidade de DNA total liberado nos fluídos corporais e, neste caso, são utilizados genes conhecidos como endógenos (Tabela 1).

Tabela 1 - Abordagens aplicadas na detecção e quantificação do DNA circulante

Marcadores	Neoplasia	Alvo	Métodos	Referências
Mutações	Câncer pancreático	<i>K-ras</i>	ASA -PCR	Sorenson <i>et al</i> , 1994
	Câncer pancreático	<i>K-ras</i>	PCR	Mulcahy <i>et al</i> , 1998
	Câncer coloretal	<i>K-ras</i> <i>TP53</i>	PCR-SSCP	Bazan <i>et al</i> , 2006
	Câncer de pulmão	<i>TP53</i>	PCR-SSCP	Gonzalez <i>et al</i> , 2000
	Câncer coloretal	<i>TP53</i>	PCR-SSCP	Wang <i>et al</i> , 2004
	Linfoma	<i>TP53</i>	PCR-RFLP	Hosny <i>et al</i> , 2009
Regiões Microsatélites	Câncer de Pulmão	D3S 3700 D3S 1283 D5S 346 D9S 171 D9S 179 RB TP53 D17S 1818 D17S 800 D20S 108 D20S 170	QPCR	Beau-Faller <i>et al</i> , 2003
	Câncer de Mama	D17S 855 D17S 654 D16S 421 TH2 D10S 197 D9S 161	PCR	Silva <i>et al</i> , 2002
Metilação	Melanoma	<i>MGMT</i> <i>RAASF1A</i> <i>RAR-β2</i>	MSP-PCR	Mori <i>et al</i> , 2005
	Neuroblastoma	<i>RAASF1A</i>	QPCR	Misawa <i>et al</i> , 2009
	Linfoma	<i>p16</i>	MSP-PCR	Deligezer <i>et al</i> , 2003
	Glioblastoma	<i>p16</i>	MSP - PCR	Balana <i>et al</i> , 2003
	Câncer de cabeça e pescoço	<i>p16</i>	QPCR	Wong <i>et al</i> , 2003
DNA Viral EBV	Linfoma Não Hodgkin	EBNA-1	QPCR	Lin <i>et al</i> , 2004
	Carcinoma de Nasofaringe	<i>Bam H1-W</i>	QPCR	Lo <i>et al</i> , 2000
	Linfoma de Hodgkin	BALF5	QPCR	Gandhi <i>et al</i> , 2006
	Linfomas	<i>Bam H1-W</i>	QPCR	Lei <i>et al</i> , 2000
	Linfomas	EBNA-1 <i>Bam H1-W</i> BALF1 LPM1 LPM2	QPCR	Ryan <i>et al</i> , 2004
	Linfoma Não Hodgkin	EBNA-1	QPCR	Au <i>et al</i> , 2004
	DLPT	EBNA-1	QPCR	Machado <i>et al</i> , 2008
	DLPT	EBNA-1	QPCR	Baiochhi <i>et al</i> , 2004
	DNA total	Linfoma	β-globina	QPCR
Câncer de Mama	β-globina	QPCR	Huang <i>et al</i> , 2006	
Câncer de Mama	GAPDH	QPCR	Zhong <i>et al</i> , 2007	
Câncer de Pulmão	GAPDH	QPCR	Gautschi <i>et al</i> 2004	
11 diferentes neoplasias	β-actina DNA mitocondrial	QPCR	Cheng <i>et al</i> , 2008	

ASA-PCR : PCR alelo específico

MSP-PCR: PCR Metilação específico

RFLP-PCR : *Restriction Fragment Length Polymorphism PCR*

QPCR: PCR em tempo real

SSCP-PCR : polimorfismo de conformação de fita simples

1.1.3 Identificação de alterações moleculares no DNA circulante

1.1.3.1 Mutações gênicas

Um reduzido número de relatos da presença de alterações cromossômicas estruturais no DNA circulante é relatado na literatura. O rearranjo clonal da cadeia pesada da imunoglobulina associado ao tumor foi detectado em amostras de DNA extraído do tumor e do plasma de 86% de pacientes com diferentes neoplasias malignas de células B (FRICKHOFEN *et al*, 1997). Adicionalmente, a amplificação do gene *N-MYC*, detectada no DNA circulante no plasma de pacientes com neuroblastoma, sugeriu ser essa uma boa ferramenta para o acompanhamento do tratamento (COMBARET *et al*, 2002). Estudos envolvendo DNA circulante e mutações foram desenvolvidos tendo como modelo neoplasias, uma vez que este tipo de alteração é comum em células tumorais. Mutação no DNA circulante foi pela primeira vez descrita por Sorenson e colaboradores em 1994. Neste estudo foi detectada mutação do gene supressor de tumor *K-ras* em amostras de soro e plasma de pacientes com adenocarcinoma pancreático. O *K-ras* é um oncogene envolvido no desenvolvimento de neoplasias humanas. Uma alta frequência e associação de mutação desse gene foi observada no DNA circulante de pacientes com câncer pancreático e cólon-retal (SORENSEN *et al*, 1994; ANKER *et al*, 1997; MULCAHY *et al*, 1998; BAZAN *et al*, 2006). Diferentes mutações presentes nos *exons* chamados de *hot-spot* do gene *TP53*, outro gene envolvido no controle do ciclo celular, foram detectadas no DNA circulante de pacientes com câncer de mama, cólon e reto, pulmão e linfoma (GONZALEZ *et al*, 2000; WANG *et al*, 2004; HOSNY *et al*, 2009).

1.1.3.2 Regiões Microssatélites

Com relação aos microssatélites, estas são regiões do genoma que apresentam seqüências repetitivas curtas e altamente polimórficas. As alterações de regiões microssatélites podem ser chamadas de desequilíbrio gênico, ou perda de heterozigidade (LOH). A LOH é caracterizada pela perda de um alelo no cromossomo de um organismo que originalmente possui dois alelos. A função biológica dessas regiões microssatélites não é bem estabelecida. No entanto, essas regiões são bastante utilizadas em análises forenses para investigação criminal e de paternidade, e na análise de sítios onde se localizam genes supressores de tumor. Alterações em regiões microssatélites, têm sido observadas no DNA circulante de pacientes com diferentes neoplasias (FLEISCHHACKER *et al*, 2007). As principais regiões escolhidas na pesquisa de microssatélites são as que se localizam no cromossomo 17, pela presença do gene *TP53*. Estudos têm mostrado alterações desta região no DNA circulante de pacientes com câncer de mama e pulmão (SILVA *et al*, 2002; BEAU-FALLER *et al*, 2003). Recentemente, Allan e colaboradores observaram LOH nessa região no DNA livre no plasma em 92% de indivíduos saudáveis, embora com hábitos que caracterizavam alto risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (ALLAN *et al*, 2001).

1.1.3.3 Modificações Epigenéticas

Modificações epigenéticas também podem ser encontradas no DNA circulante. Uma modificação epigenética muito comum no DNA é a hipermetilação da região promotora de um gene, resultando no silenciamento gênico. Isto acontece devido

a uma modificação química covalente no DNA levando a adição de radicais metil em resíduos de citosinas das repetições dos oligonucleotídeos citosina e guanina, também chamada de ilhas CpG. Células tumorais apresentam freqüentemente hipermetilação de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, na estabilidade do genoma, e também na indução da apoptose. Além do câncer, outras doenças como *diabetes mellitus* e doenças auto-imunes possuem hiper-metilação em genes importantes (HIRST, 2008). Mori e colaboradores (2005) detectaram a presença de metilação nos genes *RASSF1A* e *RAR-β2* (envolvidos no ciclo celular), e *MGMT* (responsável pelo reparo de DNA), no DNA livre extraído do soro de pacientes com melanoma. A metilação do gene *RAASF1A* também foi observada no plasma de pacientes com neuroblastoma e teve impacto na sobrevivência desses pacientes (MISAWA *et al*, 2009). O gene supressor de tumor *p16* metilado foi recentemente detectado no DNA livre no plasma em 73% dos pacientes com linfoma (DELIGEZER *et al*, 2003). Uma alta freqüência de metilação desse gene no plasma foi detectada em glioblastomas e câncer de cabeça e pescoço (BALANA *et al*, 2003; WONG *et al*, 2003).

1.1.3.4 Infecções virais

Além das alterações genéticas e epigenéticas é possível encontrar DNA circulante de origem viral em diferentes fluídos corporais. O vírus Epstein-Barr (EBV) foi o primeiro vírus associado a uma neoplasia. Recentemente, foram demonstradas altas concentrações do DNA do EBV no plasma de 95% dos pacientes com carcinoma de nasofaringe. Associação semelhante foi verificada em pacientes com linfoma de células *Natural Killer*, e em algumas neoplasias

linfóides (LO *et al*, 2000 (a); LEI *et al*, 2000, 2002). DNA do herpes vírus (HPV) também tem sido detectado no plasma de pacientes com câncer de colo uterino, com uma frequência de associação em torno de 50% dos casos (YANG *et al*, 2004).

1.1.4 Quantificação do DNA circulante em doenças não neoplásicas

Após um evento de trauma caracterizado por intensa lesão tecidual, tem sido relatado um aumento dos níveis de DNA no plasma que pode persistir mesmo 24 horas após o trauma. (LO *et al*, 2000 b). Os níveis de DNA circulante em relação à injúria térmica causada pela febre foram avaliados por Fox e colaboradores. Os resultados mostraram que as altas concentrações de DNA no plasma desses pacientes nos primeiros dois dias do quadro febril estavam relacionadas à severidade da injúria (FOX *et al*, 2008). Os acidentes vasculares são exemplos de eventos marcados por injúria tecidual. Rainer e colaboradores avaliaram os níveis de DNA no plasma como um fator de prognóstico em pacientes que apresentavam características de acidente vascular do tipo agudo. Neste estudo, 11 dos 88 pacientes que evoluíram para óbito após 6 meses, apresentaram altas concentrações de DNA no plasma em relação aos que sobreviveram. Além disso, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre os níveis de DNA no plasma e parâmetros clínicos, assim como, parâmetros para a avaliação da severidade da doença. Em seguida, o mesmo grupo mostrou uma relação entre a concentração de DNA no plasma e a presença de hemorragia nestes pacientes, sugerindo que a concentração de DNA circulante no plasma estava associada com prognóstico mais adverso e o risco de morte

(RAINER *et al*, 2003, 2007). Adicionalmente, os níveis de DNA circulante têm sido apontados como de valor prognóstico em pacientes com diferentes tipos de trauma, internados em unidades intensivas de tratamento e com risco de septicemia (RODHES *et al*, 2006).

Em estudo recente, a aplicação clínica do DNA livre no plasma foi verificada em pacientes com anemia falciforme. Vasavda e colaboradores (2006) observaram o aumento de DNA livre total no plasma em pacientes com crise falciforme caracterizada por dor aguda, quando comparado aos pacientes com doença controlada. Além disso, foi demonstrada uma correlação significativa entre a alta concentração de DNA no plasma com a proteína C reativa, contagem total de leucócitos e com a enzima desidrogenase láctica (LDH), marcadores específicos de prognóstico da anemia falciforme. Deste modo, os autores sugerem que a análise do DNA circulante no plasma pode ser um bom biomarcador para a avaliação de progressão da doença.

Os níveis de DNA circulante de origem fetal têm sido avaliados no plasma de gestantes e utilizados no diagnóstico não invasivo de uma variedade de doenças relacionadas ao curso da gravidez e ao feto (LO *et al*, 1998; CHIU *et al*, 2002). Um estudo realizado por Lo e colaboradores observou o impacto do DNA circulante no diagnóstico da eclampsia utilizando como alvo, o gene *SRY* localizado no cromossomo Y e quantificando o DNA circulante de origem fetal. Este estudo mostrou que os níveis de DNA fetal no plasma de mulheres grávidas foram capazes de prever o evento de eclampsia durante a gestação (LO *et al*, 1999 a). Além disso, outros estudos demonstraram que o DNA circulante pode ser

utilizado no diagnóstico de alterações no cariótipo fetal. Jorgez e colaboradores avaliaram os níveis de DNA circulante total no plasma em dois grupos de mulheres: aquelas em que o feto apresentava trissomia no cromossoma 21 e, aquelas nas quais o cariótipo do feto era normal. Estes pesquisadores utilizaram na quantificação por PCR em tempo real, 4 alvos do genoma não relacionados ao cromossomo 21 como *β-globina*, *GAPDH*, *β-actina* e *TP53*. Dos 4 alvos avaliados, os níveis de *β-globina* foram significativamente maiores nas mulheres em que o feto apresentava a trissomia do 21 (JORGEZ *et al*, 2007; LAPAIRE *et al*, 2007; LO *et al*, 2008). Em conjunto estes estudos apontam para uma abordagem metodológica inovadora, econômica e prática no diagnóstico pré-natal.

1.1.5 Quantificação do DNA no plasma em neoplasias

O câncer de mama está entre as doenças malignas mais comuns em mulheres em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (JEMAL *et al*, 2005). Os níveis absolutos de DNA circulante no plasma ou soro de pacientes com câncer de mama têm sido utilizados na avaliação diagnóstica e prognóstica dessas pacientes. Um fator importante com relevância no prognóstico de pacientes com câncer de mama é a presença de metástases em linfonodos na região axilar, que podem ser detectadas por ultrasonografia, ou tomografia computadorizada. (FISHER *et al*, 1983). Um estudo realizado por Umetami e colaboradores, quantificou marcadores específicos para detectar o DNA de origem tumoral no plasma tendo observado correlação entre os níveis de DNA no plasma, e a presença de metástase em linfonodos axilares antes da realização da mastectomia (UMETAMI *et al*, 2006). Em outros estudos há relatos na literatura de

que a presença de altas concentrações de DNA total no plasma está relacionada com a progressão, malignidade da doença e sobrevida em pacientes com câncer de mama (SILVA *et al*, 2002; HUANG *et al*, 2006).

Na população masculina, o câncer de próstata é a doença maligna mais comum entre os homens. Entre os parâmetros clínicos disponíveis para avaliação de prognóstico destes pacientes estão a idade, os níveis do antígeno prostático específico (PSA) e a biópsia transretal. No entanto, há relatos de que esses fatores são pouco sensíveis tanto no diagnóstico, como na detecção de progressão de doença (STAMEY *et al*, 2004). Atualmente, têm crescido as tentativas de buscar por marcadores presentes no DNA circulante, como alternativas mais sensíveis e menos invasivas para avaliação prognóstica de pacientes com câncer de próstata. Estes estudos têm mostrado que o nível de DNA circulante é uma ferramenta útil na detecção da presença da doença, possibilitando a distinção de hiperplasia prostática. Recentemente, um grande estudo envolvendo pacientes com câncer de próstata localizado, e com hiperplasia benigna não submetidos à ressecção da próstata, mostrou através de uma análise multivariada, que a concentração de DNA total no plasma era um fator preditivo de doença, independente de variáveis como os níveis de PSA e idade ao diagnóstico (CHUN *et al*, 2006). Um outro estudo em pacientes com câncer de próstata que tiveram o tratamento monitorado por 2 anos, os níveis de DNA mitocondrial e RNA no plasma foram utilizados na estimativa de sobrevida. Os resultados demonstraram que pacientes com níveis de DNA mitocondrial no plasma acima de 26.000 cópias tiveram um tempo de sobrevida global menor que aqueles que apresentaram baixas concentrações de DNA mitocondrial no plasma (MEHRA *et*

al, 2007). Há evidências de que a quantificação de DNA total no soro também pode ser utilizada como um fator independente para o diagnóstico de metástases em pacientes submetidos à ressecção de próstata (BASTIAN *et al*, 2007). Schwarzenbach e colaboradores, analisando regiões microssatélites sugerem que a presença de LOH em uma região do cromossomo 9, observada no DNA circulante derivado do tumor, pode ser um parâmetro alternativo ao PSA para o diagnóstico do câncer de próstata (SCHWARZENBACH *et al*, 2009).

O DNA circulante tem sido utilizado no diagnóstico do câncer de pulmão. A emergente aplicação desta abordagem metodológica neste tipo de câncer é motivada pela busca de um método que seja sensível na detecção da doença. A fase inicial da doença é marcada pela ausência de sintomas, o que leva a um diagnóstico tardio associado a um alto índice de mortalidade. Diversos estudos têm mostrado que a concentração elevada de DNA circulante no plasma ou soro pode ser um bom parâmetro para identificar indivíduos com doença, sugerindo um possível uso desta característica para o diagnóstico do câncer de pulmão (SOZZI *et al*, 2003; PATHACK *et al*, 2006). Sozzi e colaboradores observaram que os níveis de DNA total podem ser úteis na detecção de câncer de pulmão em indivíduos que fazem parte de grupos de alto risco para o desenvolvimento de doença, particularmente fumantes compulsivos (SOZZI *et al*, 2009). Em outro estudo, foi demonstrado que a presença de mutação do gene *K-ras* no DNA circulante estava associada com pior prognóstico em pacientes com câncer de pulmão (GAUTSCHI *et al*, 2007). Estudos recentes que acompanharam pacientes com câncer de pulmão antes e após a realização de tratamento cirúrgico, sugerem que a quantificação do DNA circulante total no plasma pode ser um marcador de

prognóstico, progressão de doença e monitoramento da resposta ao tratamento. (SOZZI *et al*, 2009; PACI *et al*, 2009).

Raros estudos têm relacionado a presença de DNA circulante a neoplasias hematológicas. Um dos primeiros estudos publicados em linfoma detectou a presença ao diagnóstico de rearranjo no *locus* da cadeia pesada da imunoglobulina de origem tumoral no plasma de 86% dos pacientes com linfomas de células B (FRICKHOFEN *et al*, 1997). Este mesmo achado foi evidenciado no soro de um paciente com linfoma de Hodgkin (LH) (KORNACKER *et al*, 1999). Há evidências de que a presença do gene *p16* metilado no plasma está associada com prognóstico adverso em pacientes com LH e linfoma não Hodgkin (LNH) (DELIGEZER *et al*, 2003). Recentemente, uma aplicação clínica do DNA circulante foi relatada por Hohaus e colaboradores em um estudo em que foram analisados ao diagnóstico 142 pacientes LH e LNH. Para isto estes autores utilizaram um fragmento do gene da *β -globina* como alvo de detecção do DNA circulante no plasma. Os resultados mostraram que os níveis elevados deste marcador no plasma estavam relacionados com uma maior probabilidade de recaída em um período de 2 anos, e também, que o nível desse marcador era um fator de prognóstico independentemente de outros fatores como a idade, estadiamento e níveis de LDH (HOHAUS *et al*, 2008).

1.1.6 DNA circulante em neoplasias associadas ao vírus Epstein-Barr

A quantificação de DNA viral derivado do tumor no plasma tem sido proposta em diversos estudos envolvendo neoplasias associadas à vírus. Dentre os vírus mais estudados está o vírus Epstein-Barr (EBV). Este vírus pertence à família *herpesviridae* e mais de 90% da população adulta em todo o mundo já foi infectada em algum momento de sua vida (ZIEGLER *et al*, 2002; FLEISCHHACKER *et al*, 2007).

O EBV é constituído por um DNA de dupla fita linear e foi inicialmente isolado em linhagens derivadas de Linfoma de Burkitt por Epstein e colaboradores. Possui um tropismo para infectar células linfóides B e, ocasionalmente, células epiteliais. A infecção primária é geralmente assintomática na infância. No entanto, no adolescente ou adulto está associado com o desenvolvimento da doença denominada mononucleose infecciosa. O vírus é secretado pela saliva, e a transmissão oral é a principal via de infecção nos humanos. A infecção da orofaringe resulta na ativação o ciclo lítico viral seguida pela infecção de células linfóides B na corrente sanguínea. Após a infecção dos linfócitos B, o DNA viral persiste no núcleo das células na forma de um episomo, estabelecendo uma infecção do tipo latente (REZK *et al*, 2007).

Na infecção latente, o EBV reduz drasticamente a quantidade de genes expressos, como uma forma de escapar do controle imunológico estabelecido pelas células T. Dentre os genes expressos estão incluídos: 6 antígenos nucleares (EBNA-1, 2, 3 A, 3B, 3C e LP), 3 proteínas de membrana (LMP 1, 2A e 2B) e 2 RNAs não codificantes (EBER 1 e EBER 2). Atualmente, através de estudos

baseados no modelo de infecção do EBV em linhagens celulares de células B, e também, análises de indivíduos soropositivos, tem sido observado 3 tipos distintos de programas de latência do vírus. Deste modo, cada programa de latência expressa um *set* de genes virais, que dão origem as chamadas de proteínas de latência, como podem ser observados na tabela 2.

O EBV está envolvido na patogênese de doenças linfoproliferativas (DLP) que afetam indivíduos imunocompetentes ou imunossupressos atuando como um co-fator cuja relevância varia de acordo com o tipo de doença. As DLP são caracterizadas por serem originadas de diferentes tipos celulares e serem patologias com perfis histopatológicos e prognóstico distintos. No grupo das DLP estão incluídos os linfomas que são subdivididos em dois grupos: os Linfomas de Hodgkin (LH) e os linfomas não Hodgkin (LNH) (HARRIS *et al*, 1999; KUTOK *et al*, 2006 ; REZK *et al*, 2007; KRISTINSON *et al*, 2009).

Tabela 2 - Padrões de latência em diferentes doenças linfoproliferativas

Programa de latência	Genes expressos	Doenças associadas so EBV
Tipo I	<i>EBNA -1, EBER 1 e 2</i>	Linfoma de Burkitt
Tipo II	<i>EBNA -1 e 2, EBER 1 e 2, LPM 1 e 2</i>	Linfoma de Hodgkin, Linfomas de células NK/T
Tipo III	<i>EBNA -1 a 6, EBER 1 e 2, LPM1 e 2</i>	DLPT, Linfoma primário do SNC, Linfomas associados a SIDA

DLPT – Doença linfoproliferativa pós-transplante

Os pacientes submetidos à transplantes podem desenvolver doença linfoproliferativa pós transplante (DLPT), a qual é dependente de fatores como o tipo de transplante, idade do pacientes, regime de imunossupressão e *status* sorológico de EBV. O EBV é fortemente associado a diferentes tipos de DLPT com aproximadamente 100% de associação nos casos que ocorrem de maneira precoce dentro de um ano após o transplante. As DLPT originadas de células B e associadas ao EBV, possuem padrão de latência do tipo III. Recentemente estudos sugerem que a expressão de todas as proteínas de latência pelo EBV possui um papel relevante na etiopatogenia das DLPT. Também outros fatores como o número de células EBV positivas na hibridização *in situ* e a queda da carga viral mensurada por QPCR nas células do sangue periférico após a redução da imunossupressão parecem reforçar o papel do EBV na patogênese da DLPT (Jaffe *et al*, 2001; Thompson *et al*, 2004).

Os pacientes são tratados com imunossupressores, drogas que são utilizadas para evitar rejeição ao enxerto. Como consequência, essas drogas provocam baixa resposta imune específica contra o vírus que é geralmente mediada por células T citotóxicas, levando a reativação do EBV, e ao possível surgimento de DLPT (REZK *et al*, 2007). Como o EBV tem um papel fundamental na patogênese da doença, a análise da presença do vírus no tumor é necessária para o diagnóstico, assim como no acompanhamento da doença. Esta identificação é realizada pela técnica de hibridização *in situ*, considerada padrão ouro na detecção do vírus no tumor. Desta forma, métodos menos invasivos que

possam detectar previamente o aparecimento de DLPT podem contribuir na estratégia de identificação e tratamento desses pacientes.

Neste contexto, alguns estudos mostram níveis elevados de DNA do EBV mensurado no sangue total de pacientes com diagnóstico de DLPT relacionada ao EBV logo após o transplante e terapêutica imunossupressora. Este achado está relacionado à reativação do vírus em resposta à ausência de resposta imune. No entanto, altas concentrações do vírus no plasma estão também associadas com a presença de DLPT ativa, pois os fragmentos virais liberados são de origem tumoral, sugerindo ser este um bom parâmetro para avaliação no diagnóstico da doença e na recaída da doença após o tratamento. (TSAI *et al*, 2008). Quando a recidiva da doença é diagnosticada tardiamente, os pacientes geralmente encontram-se fisicamente debilitados e o tratamento agressivo com quimioterapia acaba resultando em óbito. Com base neste conhecimento a busca de um marcador mais específico pode auxiliar no diagnóstico mais precoce de recidiva e orientar decisões terapêuticas (MAMZER-BRUNEEL *et al*, 2000). Recentemente, tem sido demonstrado que o fragmento *EBNA-1* do genoma viral é um bom marcador de resposta ao tratamento nos pacientes com DLPT. A queda dos níveis deste marcador durante o curso do tratamento é característica de pacientes que respondem ao tratamento e alcançam a remissão completa (BAIOCHHI *et al*, 2004; TSAI *et al*, 2008; MACHADO *et al*, 2008).

O carcinoma de nasofaringe (CNF) é uma doença maligna relacionada ao EBV. Há relatos na literatura que reforçam que o vírus possui um papel na patogênese e no prognóstico da doença (RAAB-TRAUB *et al*, 2002). A

radioterapia é principal tratamento utilizado nos pacientes com CNF e a presença do DNA do EBV no plasma tem sido descrita como uma alternativa não invasiva para avaliação de prognóstico e resposta ao tratamento. Há relatos que mostram a queda dos níveis do DNA do EBV a níveis indetectáveis no plasma de pacientes com CNF após tratamento com radioterapia (CHAN *et al*, 2003). Lo e colaboradores detectaram a presença do vírus no soro de 96% dos pacientes com CNF. Neste estudo, os autores também demonstraram que a persistência de EBV no plasma após o tratamento com radioterapia foi relacionada com a recaída da doença (LO *et al*, 1999 b). Resultado similar foi observado em pacientes com doença avançada. Níveis elevados do marcador *EBNA-1* ao diagnóstico, acima de 1500 cópias/mL, foram encontrados em pacientes acompanhados por dois anos que apresentaram recidiva da doença (LIN *et al*, 2004). Testes sorológicos que indicam e quantificam a presença de imunoglobulina A (IgA) anti-EBV têm sido utilizados para o diagnóstico de associação da doença com o vírus, e também como fator de prognóstico. Shao e colaboradores mostraram que os níveis de DNA do EBV no plasma correlacionavam-se com o teste sorológico no diagnóstico da associação do EBV com a doença. No entanto, a quantificação do DNA viral mostrou-se mais sensível na correlação com o estágio da doença, na avaliação de prognóstico e no monitoramento da resposta ao tratamento (SHAO *et al*, 2003).

Vários estudos recentes têm usado métodos de quantificação do EBV para avaliar prognóstico e resposta ao tratamento de pacientes com linfomas associados ao EBV (ZIEGLER *et al*, 2002; FLEICHHACKER *et al*, 2007). Um estudo recente mostrou que pacientes com LH-EBV positivos, ao diagnóstico, possuíam níveis elevados de DNA do EBV livre no plasma quando comparados a

um grupo controle formado por pacientes com LH-EBV negativos e LH-EBV positivos apresentando remissão da doença. Após o tratamento, níveis indetectáveis do vírus no plasma desses pacientes foram correlacionados com a boa resposta ao tratamento (GANDHI *et al*, 2006). Au e colaboradores mostraram em um grupo de 39 pacientes com linfomas, incluindo LNH, que ao diagnóstico, os níveis de *EBNA-1* no plasma foram fortemente correlacionados a fatores utilizados na prática clínica para aferição do prognóstico como a idade, o estágio, os níveis de LDH e o índice de prognóstico internacional (IPI). Além disso, foi observado que os níveis de EBV no plasma ao diagnóstico estavam associados com uma diminuição da sobrevida global e sobrevida livre de doença. Em conjunto, os resultados dos autores sugerem que esse marcador pode ser utilizado como um marcador independente para avaliação de prognóstico e monitoramento da resposta ao tratamento de pacientes com linfomas associados ao EBV, especialmente quando a associação com o vírus é alta (AU *et al*, 2004).

Neste contexto, o EBV também está fortemente associado a alguns subtipos de LNH em pacientes com diferentes *status* de imunossupressão. Há relatos de que em pacientes com LNH-AIDS o EBV está presente em 50% dos pacientes que desenvolvem linfoma difuso de grandes células B (LDGC-B), 100% nos linfomas primários do sistema nervoso central, e aproximadamente 30% dos casos com linfoma de Burkitt (LB) (HJALGRIM *et al*, 2008). Apesar dos LNH na maioria dos casos serem neoplasias originadas de células B, que são preferencialmente infectadas pelo EBV, tem sido relatada a presença do vírus em pacientes com linfoma de células NK ou T, um subtipo histológico de LNH originado de células T. Este linfoma é muito freqüente na Ásia, onde em

determinadas regiões chega a representar 25% dos casos de LNH. Recentemente, dois estudos mostraram diferentes percentuais de associação do EBV que variaram entre 47% e 96% em pacientes com linfoma de células NK/T (LEI *et al*, 2002 ; AU *et al*, 2004).

1.2 Linfomas Não Hodgkin

1.2.1 Linfoma de Burkitt

O LB é um subtipo histológico de LNH altamente agressivo que foi descrito pela primeira vez na África por Dennis Burkitt em 1958. São tumores originados de células linfóides B maduras, compostos por uma população monomórfica de células B transformadas, de tamanho médio, e com citoplasma basofílico. As células tumorais apresentam alta taxa de proliferação e o tumor pode dobrar de tamanho em um curto espaço de tempo. Paradoxalmente, o tumor apresenta intensa morte celular por apoptose. O LB apresenta um padrão histológico chamado de “céu estrelado” devido à presença de inúmeros macrófagos que atuam na fagocitose dos corpos apoptóticos gerados pelas células tumorais. Com relação ao imunofenótipo o tumor é caracterizado pela presença da imunoglobulina IgM na superfície da membrana, antígenos associados a células linfóides B maduras como CD19, CD20, CD22, CD10, BCL6, CD38, CD77 e CD43 e ausência de BCL-2 e *Terminal Deoxynucleotidil Transferase* (TdT). Além disso, aproximadamente 100% das células são positivas para a proteína Ki67 um excelente marcador de proliferação celular (LEONCINI *et al*, 2007 ; BLUM *et al*, 2004).

Os principais eventos citogenéticos associados à patogênese do LB são translocações envolvendo o cromossomo 8 na banda 24q, onde se localiza o protooncogene *c-myc*, um gene crítico na regulação da proliferação, e o locus da cadeia pesada dos genes da imunoglobulina (Ig) no cromossomo 14q32. Este tipo de translocação denominada como 8;14 corresponde a 80% das translocações no LB, os outros 20% são as variantes t 2;8 e t 8;22. Como resultado da translocação, o protooncogene *c-myc* fica sob a influência dos promotores das imunoglobulinas levando a uma superexpressão da proteína c-MYC ou expressão ectópica da mesma, com ganho de função (DOMINGUEZ-SOLA *et al*, 2007). A proteína c-MYC é um fator de transcrição que atua nas células B regulando a transcrição de aproximadamente 15% de todos os genes, principalmente os envolvidos no ciclo celular, proliferação e apoptose. A ativação de MYC e a expressão ectópica nas células do LB produz proliferação incontrolada e aumento da instabilidade genômica. Em células normais, a potente atividade proliferativa de MYC é balanceada pelo aumento da apoptose, mediada pelas vias de p53 e BIM. No entanto, no LB estas vias podem ser silenciadas por eventos genéticos (mutações) – mutação do gene *TP53* –, e epigenéticos como a hipermetilação da região promotora de alguns genes relacionados à apoptose. Estudos recentes *in vitro* têm mostrado o silenciamento de vias importantes da apoptose, incluindo a proteína BIM. Este silenciamento pode ser induzido pela ação de proteínas de latência produzidas pelo EBV. Entre outros, esses fatores contribuem para gênese do tumor induzida pela ativação de MYC. Do ponto de vista de diagnóstico, as principais técnicas empregadas no diagnóstico da translocação *myc/Ig* são a hibridização *in situ* fluorescente (FISH), em tumor fresco ou em amostras incluídas

em parafina, e o PCR de longa distância. No entanto, os diferentes padrões de ponto de quebra nos locos dos cromossomos envolvidos nas translocações encontradas nas variantes do LB dificultam o diagnóstico por PCR (KLUMB *et al*, 2001 ; FERRY *et al*, 2006; THORLEY-LAWSON *et al*, 2009).

Segundo a classificação mais recente da Organização Mundial de Saúde, existem três tipos de variantes clínicas de LB reconhecidas, cada qual com diferentes apresentações clínicas e frequência de associação com o EBV: endêmico, esporádico e associado à imunodeficiência. **LB endêmico:** ocorre na África equatorial e é mais comum em crianças entre 4 e 7 anos de idade, com uma taxa de incidência variando entre 5 e 10 casos por 100.000 crianças. Os sítios de apresentação clínica da doença em 50% dos casos encontram-se na região mandibular ou outros ossos da face. Contudo, também acometem gônadas, rins, glândulas salivares e seios maxilares e nasais. **LB esporádico:** é encontrado fora da África e difere do LB endêmico pelos sítios de acometimento da doença que geralmente envolvem regiões do abdômen, principalmente a região ileocecal. Estimativas apontam que nos Estados Unidos (EUA) a incidência de LB é 50 vezes menor do que na África, e representa de 30 a 50% de todos os linfomas da infância. **LB associado à imunodeficiência (LB-AIDS):** esta variante está associada ao HIV. O LB-AIDS representa um terço dos linfomas encontrado em adultos infectados pelo HIV e geralmente aparecem como um dos primeiros sintomas da AIDS (LEONCINI *et al*, 2007; GEMMA *et al*, 2007).

A frequência de associação do vírus com o LB varia dependendo do tipo de variante clínica. No LB endêmico, o EBV está presente no tumor em 100% dos

casos. Em menor proporção, o LB esporádico apresenta 15% - 30% de associação com o EBV, e 30% a 40% dos casos de LB-AIDS nos EUA (GEMMA *et al*, 2007).

Estudos prévios realizados na população brasileira sugerem que o LB apresenta uma alta associação com o EBV (87%) na região nordeste (ARAÚJO *et al*, 1996; SANDLUNG *et al*, 1997) e associação em torno de 60 % na região sudeste do país (KLUMB *et al*, 2004 a; HASSAN *et al*, 2006). Recentemente foi publicado um estudo realizado em 234 pacientes adultos e pediátricos com diagnóstico de LB ou LB-AIDS das cinco principais regiões do país. Os resultados corroboram os estudos prévios. No entanto, a pequena quantidade de pacientes das regiões norte e centro-oeste que participaram do estudo impossibilitaram uma melhor definição do *status* epidemiológico do LB nesta região do Brasil. Além disso, o LB foi predominante em indivíduos do sexo masculino (razão M/F, 2.8:1) e em pacientes pediátricos (64% dos casos). O principal sítio de acometimento da doença foram os órgãos abdominais em 81% dos casos. Em menor proporção (5 casos) foi observado tumor afetando a região mandibular, típico do LB endêmico. No entanto, de acordo com os dados do estudo os autores sugerem que no Brasil o LB é esporádico. Entre os 14 pacientes LB-AIDS, 12 foram adultos e 2 casos pediátricos, com maior frequência de doença em sítios nodais. Os autores observaram em pacientes adultos e pediátricos uma associação intermediária com a presença do EBV em 52,7% dos casos de LB, utilizando a técnica de hibridização *in situ* (ISH). A maior frequência de associação foi encontrada na região norte, onde 76% dos casos foram EBV positivos, contudo nas regiões nordeste e sudeste a associação observada foi de 63% e 50% dos casos de LB,

respectivamente. (QUEIROGA, 2008 a). Em outro estudo publicado por este mesmo grupo foi observado um predomínio de associação do LB com o vírus em pacientes pediátricos. Dos 128 pacientes EBV positivos, 76 casos (56,7%) ocorreram em pacientes jovens menores que 16 anos (QUEIROGA, 2008 b).

O prognóstico dos pacientes com LB mudou drasticamente nas duas últimas décadas com a introdução de quimioterapia intensiva de curta duração (REITER *et al*, 1999, PATTE *et al*, 2002). Os fatores prognósticos utilizados na clínica para avaliação da resposta ao tratamento dos pacientes com LB são baseados na apresentação clínica do paciente, estando relacionados ao tamanho do tumor aferido pelos níveis da LDH e sítios de acometimento da doença. Estes parâmetros ajudam a estratificar pacientes em diferentes grupos de risco. Pacientes com doença de alto risco geralmente apresentam acometimento de medula óssea e sistema nervoso central, tumor maior que 10 cm e altos níveis da enzima LDH, acima de duas vezes o valor normal (≥ 1000 U/L). Usando estes parâmetros os novos protocolos de tratamento dos LNH-B têm proporcionando excelentes resultados, mostrando uma sobrevida livre de eventos maior que 80% em pacientes com estágios avançados da doença e níveis da enzima LDH > 1000 UI/L (SWEETENHAM *et al*, 2008 ; PATTE *et al*, 2007). Contudo, existe um subgrupo com doença avançada e elevação da enzima LDH acima de 1000 UI/L que não responde ao tratamento e/ou apresenta recidiva e, para estes pacientes, nenhuma terapêutica de resgate é eficaz. Este grupo de pacientes refratários, em nossa instituição, corresponde a 17% das crianças com LNH-B (a maioria LB) como mostrado em estudo publicado recentemente (KLUMB *et al*, 2004 b). Marcadores para identificação de pacientes com prognóstico adverso e, ou que

auxiliem na identificação da falha ao tratamento podem ajudar a orientar decisões terapêuticas.

1.2.2 Linfomas associados ao HIV

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) está associada com o risco de desenvolvimento de Linfomas não Hodgkin (LHN-AIDS), sendo considerada uma manifestação inicial da AIDS. Os LNH-AIDS são em sua maioria agressivos e predominantemente originados de células B (>80%). Segundo a última classificação da OMS, entre esses linfomas estão os que geralmente são diagnosticados em pacientes imunocompetentes, linfomas que são específicos de pacientes HIV positivos, e aqueles que ocorrem em outras formas de imunodeficiência (RAPHAEL *et al*, 2001) (Tabela 2).

Em geral, os LNH-AIDS compreendem os seguintes subtipos histológicos: linfoma de Burkitt (LB), linfoma difuso de grandes células (LDGC) com características de centroblástico (LC) e LDGC com características de imunoblástico (LI). Os linfomas específicos de pacientes HIV positivos podem ocorrer de maneira primária no SNC ou como um linfoma primário em líquido seroso (Effusion primary lymphoma), bem como linfoma da cavidade oral (FERRY *et al*, 2006; GAIDANO *et al*, 1995; RAPHAEL *et al*, 2001).

Tabela 3 – Categoria dos Linfomas associados ao HIV (OMS)

CATEGORIAS DOS LINFOMAS ASSOCIADOS AO HIV Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS)
Linfomas que também ocorrem em indivíduos imunocompetentes
Linfoma de Burkitt
Classico com diferenciação plasmocitóide Atípico
Linfoma difuso de grande células
Centroblástico Imunoblástico
Linfomas da zona marginal de tecido associado á mucosa (MALT)
Linfoma T periférico
Linfoma de Hodgkin clássico
Linfomas que ocorrem especificamente em indivíduos HIV positivos
Linfoma primário de líquido seroso
Linfoma plasmoblástico da cavidade oral
Linfomas que também ocorrem em outros tipos de imunodeficiência
Linfoma B polimórfico

Diversos fatores estão envolvidos na patogênese dos LNH-AIDS, incluindo alterações genéticas, estimulação antigênica crônica, desregulação na expressão de citocinas e infecções por vírus conhecidos como oncogênicos entre eles o EBV e o HHV-8. Segundo a OMS, o EBV pode ser identificado nas células neoplásicas de 60% dos casos de linfomas-AIDS. Nos linfomas primários de SNC e primário de líquido seroso, ambos específicos de pacientes HIV positivos, essa associação com o EBV é alta e corresponde aproximadamente a 100% e 70%, respectivamente. Entre os LDGCB com características imunoblásticas, a frequência de associação é de 80% e no LB varia entre 30% a 50%.

Recentemente, foi observado em uma coorte de pacientes brasileiros com LNH-AIDS que em 71% dos casos, o EBV estava presente no tumor. Além disso, nesse estudo também foi mostrada uma predominância de pacientes adultos com faixa etária acima de 16 anos (QUEIROGA *et al*, 2008 b). Apesar da frequência de associação do EBV com os LNH-AIDS ser alta, o papel do EBV na patogênese dos linfomas-AIDS não está totalmente elucidado até o momento. No entanto, há relatos que no LDGCB-AIDS a expressão da proteína viral LPM-1, uma proteína oncogênica, pode estar relacionada à transformação e proliferação maligna das células B (RAPHAEL *et al*, 2001; TRAN *et al*, 2008).

Há relatos na literatura de que a introdução da terapia antiretroviral ativa (HAART) na década de 90 aumentou a sobrevida global dos pacientes HIV, mesmos aqueles com fatores de prognóstico adversos como IPI de alto risco (score 2 e 3), estágios II e IV da doença e níveis elevados da enzima LDH. Além disso, alguns estudos indicam que este tratamento tem diminuído a incidência dos linfomas LNH-AIDS. Entretanto, os LNH-AIDS continuam sendo uma das principais causas de mortalidade entre pacientes portadores do HIV. Neste contexto, alguns fatores biológicos como a contagem de linfócitos CD4 ao diagnóstico < 500 células / μ L, e a aferição da carga viral através do mRNA do HIV no plasma têm sido utilizados com sucesso para identificar pacientes HIV positivos com risco de desenvolver LNH-AIDS (HOFFMANN *et al*, 2003; KIRK *et al*, 2001; BONNET *et al*, 2006; SPANO *et al*, 2008).

Recentemente, estudos que utilizaram a carga viral do EBV aferida na fração celular do sangue periférico como um marcador de diagnóstico dos LNH-

AIDS têm demonstrado que o aumento do número de cópias do EBV está associado à redução de células CD4. No entanto, o valor preditivo da quantificação do EBV na fração celular do sangue, relacionado ao desenvolvimento de LNH em pacientes HIV positivos, parece contraditório (BONNET *et al*, 2006, RIGHETTI *et al*, 2002). A detecção do DNA do EBV também tem sido observada no plasma e no líquido de pacientes LNH-AIDS. Um estudo recente realizado por Fan e colaboradores (2005), sugere que a aferição da carga viral do EBV no plasma pode ser um marcador preditivo de resposta ao tratamento também nos LNH-AIDS, embora esses autores não tenham observado correlação da carga viral do EBV com a contagem de células CD4 e com a carga viral do HIV (BOSSOLASCO *et al*, 2002 ; FAN *et al*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Avaliar a relevância da quantificação do DNA circulante total e do EBV como marcador biológico em pacientes com linfomas não Hodgkin

2.1.1 Objetivos específicos:

- Desenvolver uma metodologia de quantificação do EBV em pacientes com linfomas associados ao EBV.
- Analisar quantitativamente o DNA circulante total em pacientes com LNH-B pediátricos e adultos jovens;
- Investigar se a quantificação do DNA do EBV no plasma ao diagnóstico dos LNH-B pediátricos pode indicar associação do tumor ao EBV;
- Determinar a correlação dos níveis de DNA circulante total e do EBV com a resposta ao tratamento em pacientes com LNH-B pediátricos;
- Investigar a carga viral do EBV em pacientes com LNH associados à AIDS;
- Avaliar o impacto da carga viral do EBV na sobrevivência de pacientes com LNH associados à AIDS.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Pacientes e controles

3.1.1 Seleção dos pacientes com LNH-B

Um total de 29 pacientes pediátricos e adultos jovens com diagnóstico de LNH-B matriculados no Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA) foram selecionados prospectivamente no período de março de 2006 a março de 2009. Todos os pacientes foram tratados de acordo com o protocolo LNH-98, adaptado do protocolo BFM 86-90. Os pacientes receberam inicialmente citoredução com ciclofosfamida e prednisona. Em seguida, os pacientes foram tratados com 4 a 6 ciclos de poliquimioterapia de acordo com o grupo de risco (Klumb *et al*, 2004) Amostras de sangue periférico desses pacientes foram coletadas em 5 momentos que compreenderam desde o momento do diagnóstico da doença, até 6 meses após o término do tratamento. Os dados demográficos e clínicos como idade, sexo, níveis da enzima LDH e estágio dos pacientes ao diagnóstico foram obtidos através do acesso *on line* aos resultados do HCI-INCA e consulta aos prontuários. O subtipo histológico do LNH foi classificado de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) (LEONCINI, 2007). Quanto ao estadiamento dos pacientes, foi utilizado o sistema *St Jude Children's Research Hospital* que classifica em uma escala de I a IV o estágio da doença, levando em consideração características observadas ao diagnóstico como o sítio e número de regiões de envolvimento da doença (MURPHY, 1989). Antes da coleta das amostras, foi obtido o Termo de Consentimento Livre e Informado cuja

redação foi previamente revista quando da aprovação do projeto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa no INCA – CEP nº 122/04 (Anexo 1). Os dados obtidos na apresentação clínica dos pacientes estão descritos no anexo 3.

3.1.2 Seleção dos pacientes LNH-AIDS

Pacientes com diagnóstico de LNH-AIDS matriculados no Serviço de Hematologia do INCA foram estudados retrospectivamente. Este projeto também foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA – CEP nº 098/06 (Anexo 2). Um total de 42 pacientes do período de Janeiro de 2003 a Fevereiro de 2007 tiveram analisadas suas amostras de plasma/soro do momento do diagnóstico. Os dados demográficos e clínicos no momento do diagnóstico do LNH foram obtidos através de consulta aos prontuários e/ ou consulta à rede interna *on line* do HC-I. O subtipo histológico do LNH foi classificado segundo critérios morfológicos da classificação da OMS (LEONCINI *et al*, 2007) e o estadiamento pelo sistema Ann Arbor (ROSENBERG, 1966). Para estratificação dos pacientes em grupos de baixo, intermediário, ou alto risco foi utilizado o Índice de Prognóstico Internacional (IPI), que considera no seu sistema de pontuação: gênero, idade ao diagnóstico, níveis da LDH, estágio, *performance status* do paciente, número de sítios de envolvimento da doença, tamanho do tumor, sintomas como emagrecimento, sudorese e febre (presentes ou ausentes), e níveis de albumina sérica (COIFFER *et al*, 1991).

3.1.3 Seleção dos controles

Participaram do estudo 20 indivíduos saudáveis voluntariamente recrutados no momento da doação de sangue no Serviço de Hemoterapia do INCA. Adicionalmente, as amostras de soro de 2 pacientes com diagnóstico prévio de LNH-B EBV positivo foram selecionadas como controles positivos nos ensaios para a verificação da eficiência da extração e amplificação do EBV no plasma. O DNA das linhagens celulares derivadas de LB, Namalwa e Raji foi utilizado nas reações como controles positivos da reação, assim como, padrão quantitativo nos ensaios de QPCR. As células foram cultivadas em meio de cultura contendo RPMI e soro fetal bovino e a cada passagem foi separada uma alíquota contendo 3×10^6 células para a extração de DNA com o reagente comercial *DNA QIAmp DNA mini Kit* (QIAGEN).

3.2 **Avaliação histopatológica das amostras tumorais**

3.2.1 Preparo das amostras tumorais e diagnóstico histopatológico

Os fragmentos de tumor após a biópsia no momento do diagnóstico foram fixados em formalina a 30 % e incluídos em parafina. Os blocos de parafina contendo o tumor foram submetidos a cortes histológicos de $3\mu\text{m}$ de espessura utilizando um micrótomo. Os cortes foram dispostos em lâminas previamente tratadas com poly-L-lisina. Em seguida, uma lâmina corada com os corantes hematoxilina/eosina foi utilizada para revisão histopatológica do subtipo do LNH por 2 patologistas independentes (Dr^a Lídia Maria M. de Rezende e Dr. Carlos E. Bacchi). O perfil imunofenotípico foi determinado através da utilização de um painel de anticorpos monoclonais: LCA, CD45; L26, CD20; UCHL-1, CD45-RO e

CD3 (DAKO, Carpinteria, CA). Os outros cortes foram guardados em caixas apropriadas para lâminas à temperatura ambiente, até a realização da detecção do EBV no tumor por hibridização *in situ*. Este procedimento foi realizado somente para o grupo de LNH-B pediátrico. No caso dos LNH-AIDS, o diagnóstico foi confirmado através de consulta ao módulo de resultados de exames denominado Anatomia Patológica da rede interna *on line* do HC-I

3.2.2 Detecção do EBV

A presença do EBV no tumor foi investigada por hibridização *in situ* através da utilização de uma sonda biotinizada tendo como alvo o transcrito viral *EBER-1* constitutivamente expresso em células com infecção latente (Glickerman *et al*, 1988; Weiss *et al*, 1991). As lâminas contendo as cortes tumorais, previamente tratadas com poli-L-lisina foram incubadas a 70°C para a remoção de parafina das amostras. Em seguida, a atividade endógena da peroxidase foi bloqueada com uma solução de H₂O₂ a 3%. A digestão enzimática foi realizada com Proteinase K (concentração final de 0,02 µg/µL), e em seguida o tecido tumoral foi desidratado em etanol absoluto e secado em temperatura ambiente. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas em uma solução pré-hibridização (20 mM de fosfato de sódio, 1X solução de Denhardt's, 0,1% de sulfato dextran) por 60 minutos a 37°C, sendo então adicionada a sonda EBER-1 biotinizada (0,25 ng/mL) e as amostras incubadas *overnight* a 37°C em uma câmara escura. A amplificação do sinal foi feita com o *kit* comercial ABC Elite (Vector, Burlingame, CA) e a revelação foi realizada com uma solução de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma, St Louis, MO). As lâminas foram contra-coradas com *methyl green* e depois montadas em resina. A

observação dos resultados foi feita em microscópio convencional. Os controles positivos consistiram de casos com diagnóstico prévio de LNH associado ao EBV. Estes ensaios foram realizados em parceria com o professor Carlos Bacchi no laboratório de Consultoria em Patologia na cidade de Botucatu, São Paulo.

3.3 Análise quantitativa do DNA livre no plasma dos pacientes e controles

3.3.1 Coleta e armazenamento das amostras de plasma

O sangue periférico dos pacientes foi coletado por punção venosa em tubos de 8mL contendo heparina. Após a coleta, a amostra foi submetida à centrifugação com velocidade de 741 x G por 15 minutos para retirada da fração celular do sangue e obtenção do plasma. Alíquotas de 400µL de plasma foram colocadas em tubos de 1,5 mL e armazenadas na temperatura de – 20°C até o momento da extração do DNA.

3.3.2 Extração de DNA

Antes do início da extração do DNA, as alíquotas de plasma foram novamente centrifugadas para retirada de possíveis resquícios celulares presentes nas amostras. Uma alíquota de 400 µL de plasma de pacientes e indivíduos saudáveis foi utilizada na extração do DNA. Para a obtenção do DNA da linhagem celular Raji e Namalwa foi utilizado um *pool* contendo $3,0 \times 10^6$ células. O método de escolha para a extração do DNA foi a utilização do reagente comercial *QIAmp DNA mini Blood kit* (QIAGEN). Neste método, a primeira etapa da extração consiste da incubação do plasma com 20µL da solução de protease a 56°C para a

retirada de proteínas presentes na amostra. Em seguida é adicionada à solução, etanol absoluto utilizado para a aderência do DNA junto a uma matriz de sílica localizada dentro da coluna de extração, que se dá pela centrifugação da solução na velocidade de 8, 23 x G por 1 minuto. Após a aderência do DNA junto à matriz, há duas etapas seguidas de centrifugação (16,110 x G por 3 minutos) para a limpeza do DNA é adicionada à coluna, os tampões AW1 e AW2, respectivamente. Na última fase, o DNA é retirado da matriz de sílica com o tampão AE que é também utilizado para a eluição dos ácidos nucleicos. A quantidade de DNA genômico, assim como a pureza das amostras obtidas, foi determinada por densidade ótica através de leitura em espectrofotômetro (NanoDropOND-1000 UV-Vis)

3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a detecção do DNA no plasma por PCR foram utilizados pares de iniciadores específicos para os genes *EBNA-1* (genoma viral), e *β-globina* e *GAPDH* para o genoma humano. O número de acesso da seqüência referência no *GeneBank*, bem como as seqüências dos iniciadores e tamanho do produto amplificado estão listados na tabela 1. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 50µL, contendo 50 mM de KCL, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Invitrogen), 25 pmoles de cada iniciador, 4 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e um volume de 5µL de DNA extraído do plasma e das linhagens (60 ng). Em cada reação de PCR foram utilizados controles negativos, constituídos pelos mesmos

reagentes, mas não contendo DNA. A amplificação foi realizada em tubos de 500 μ L, em termociclador (MJ Research PTC 100). O programa da reação de PCR consistiu das seguintes etapas: 95°C por 5 minutos (desnaturação inicial) e 35 ciclos de amplificação (95°C, 2 minutos, 56°C por 1 minuto, 72°C por (1 minuto) e 72°C, 5 minutos. Após a amplificação o produto de PCR foi submetido à eletroforese a 100 volts por 40 minutos em gel de acrilamida-bis acrilamida a 8%, ou gel de agarose a 2%. A detecção de amplificação foi realizada através de coloração por prata e revelação com hidróxido de sódio ou por intercalação do DNA por brometo de etídio excitado por luz ultra violeta (SAMBROOCK, 1989).

3.4 PCR em tempo real (QPCR)

A quantificação do DNA livre no plasma por QPCR foi realizada utilizando conjuntos de iniciadores e sondas TaqMan® (Applied Biosystems) desenhadas especificamente para as regiões dos genomas viral e humano com o auxílio do software *PrimerExpress* v.2.0 (Applied Biosystems) (Tabela 3). A reação de amplificação do DNA foi feita em um volume de reação de 20 μ L contendo os reagentes: 1X Taqman universal Master Mix (Applied Biosystems), 1X iniciadores e sonda *Taqman* e 5 μ L de DNA extraído do plasma ou das linhagens. A amplificação foi realizada em placas de PCR contendo 48 poços (Applied Biosystems). Após a adição dos reagentes de amplificação, a placa foi selada com o adesivo óptico Microamp® (Applied Biosystems). A reação de amplificação foi realizada no termociclador de QPCR StepOne (Applied Biosystems) de acordo com a seguinte condição de termociclagem: 50°C por 2 minutos, para ativação da enzima Taq polimerase; 95°C, 10 minutos, para a desnaturalização inicial do DNA e

40 ciclos de: 95°C, 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Os dados da amplificação foram obtidos pelo software *Sequence Detection System* fornecido pelo fabricante do equipamento de QPCR.

Durante a reação de amplificação é possível observar 3 fases: a fase basal, onde quantidade de fluorescência emitida pela formação de produto de PCR não é suficiente para ser detectada ; a fase exponencial, marcada pelo ciclo threshold (CT) em que a fluorescência começa a ser detectada e a amplificação acontece de maneira exponencial ; e a fase de platô, a qual não mais ocorre formação de produtos.

No presente estudo, como forma de padronizar a interpretação dos dados obtidos após a amplificação, o modo automático foi utilizado como parâmetro para a análise do CT. Além disso, a reação de QPCR foi aceita se fossem obtidos valores de coeficiente de correlação (r) próximo a 1 (um) e eficiência variando entre 85% a 100%.

Tabela 4 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores

PCR				
Nome do gene	Símbolo	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (5' - 3')	Amplicon (bp)	Nº acesso GeneBank
Epstein-Barr nuclear antigen 1	<i>EBNA-1</i>	CTATGTCTTGGCCCTGATCC TGTCTGACAGCGACCATGA	93	V01555
Beta-globin	<i>β-globin</i>	CAACTTCATCCACGTTACCC GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	298	Hs 11_9394
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	AAG GCC AGG CTG TAA ATG TCA CCG ACA AAA GGG ACA GAG ACT GGG	333	Hs12_9916
PCR em tempo real				
Nome do gene	Símbolo	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas (5' - 3')	Amplicon (bp)	Nº acesso GeneBank
Epstein-Barr nuclear antigen 1	<i>EBNA-1</i>	GGACCTGGAATGGCCTAGGA CCGCCGGAGCCTTCTG NQF - CAGATGTGTCTCCCTTCTC - FAM	60	V01555
Beta-globin	<i>β-globin</i>	GCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGA GCCTATCAGAAACCCAAGAGTCTTC NQF - CACATGCCAGTTTCT - FAM	93	Hs 11_9394
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	CCCACTCCTGATTTCTGGAAAAGAG GGCGGGTGGGAAGAG NQF - CTTGGCAAATCAAAGCC - FAM	106	Hs12_9916

A análise da concentração de DNA total e do EBV no plasma foi realizada pelo método de quantificação absoluta, na qual foi necessária a construção de curvas padrões para os alvos gênicos *β-globina* e *EBNA-1*, respectivamente. Estas curvas foram obtidas com diluições seriadas da linhagem celular Raji utilizada como padrão quantitativo. Cada célula da linhagem contém 50 cópias do vírus, e uma cópia ou genoma equivalente de *β-globina*. A curva para a detecção do EBV foi construída com 5 diluições seriadas em log 10 contendo de 50000 a 5 cópias do EBV/μL. Para o DNA total as diluições foram entre 40000 e 4 cópias de *β-globina* /μL. As diluições foram estocadas em freezer na temperatura de -20°C, até a realização dos ensaios de QPCR.

Cada amostra de pacientes foi testada em triplicata. Em cada placa de reação foram adicionados, além do DNA das amostras dos pacientes, amostras de DNA extraídas do plasma de pacientes com LNH EBV positivos, e amostras de DNA de indivíduos saudáveis, controles negativos (sem DNA), além das amostras da curva padrão previamente diluídas. Para verificar resultados falsos negativos devido à presença de contaminantes na amostra de plasma de pacientes e controles, todas as amostras foram submetidas à amplificação do gene endógeno *GAPDH*, ou através da amplificação de um DNA exógeno obtido comercialmente (IPC MasterMix – Applied Biosystems), previamente adicionado ao plasma antes da realização da extração de DNA.

Ao final do ensaio de QPCR, a concentração de DNA total, ou do EBV no plasma de cada paciente e controles foi estimada em cópias/mL utilizando a seguinte fórmula (LO *et al*, 1998):

$$C = Q \times \frac{V_{DNA}}{V_{PCR}} \times \left(\frac{1}{V_{ext}} \right)$$

Onde, **C** é o número de cópias por mL de plasma, **Q** é o número de cópias detectado pelo sistema, **VDNA** é o volume total de DNA extraído, **VPCR** é o volume de DNA usado na reação e **VEXT** é o volume de plasma utilizado na extração.

3.5 Análise Estatística

O teste de coeficiente Kappa foi utilizado na comparação entre os métodos de detecção do EBV no plasma e no tumor, onde $p = 1$ é igual a 100% de correlação. Para comparar os níveis de DNA entre pacientes e controles, ou entre diferentes momentos no curso tratamento foi realizado uma análise não paramétrica pelo teste u de Mann-Whitney com p significativo sendo menor que 0,05. Na avaliação da sensibilidade e a especificidade da quantificação do DNA circulante total foi utilizada a curva *Receiver operating characteristic* (ROC). A probabilidade de sobrevida global (SG) foi estimada usando o método de Kaplan-Meier. A SG foi calculada da data do diagnóstico até a data do óbito relacionado à doença ou perda de seguimento. Os pacientes que evoluíram para o óbito por complicações do tratamento foram excluídos da análise. Para comparação das curvas de Kaplan-Meier foi utilizado o teste de log-rank com valor de p considerado significativo se inferior a 0,05. Para a geração dos dados estatísticos foi utilizado o programa GraphPad Prism (v.5.0).

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-B

4.1.1 Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-B pediátricos e adultos jovens

Nos 29 pacientes com LNH-B (pediátricos e adultos jovens) envolvidos no estudo houve um predomínio de pacientes do gênero masculino (75%) em relação aos do feminino (25%) e a faixa etária variou entre 2 a 19 anos com mediada de 9 anos. Quanto ao subtipo histopatológico, 29 pacientes foram diagnosticados com LB e 2 pacientes com LDGCB. Os pacientes com LB tiveram mediana de idade menor (8 anos) em relação aos pacientes com LDGCB (15 anos). Entre 29 casos de LNH-B pediátrico foi incluído um paciente que desenvolveu LDGCB após transplante renal e uso de drogas imunossupressoras. De acordo com o sistema de estadiamento do *St Jude Children's Research Hospital* (Diebold *et al*, 2001), 75 % dos pacientes tiveram estágio III / IV, e 25% doença com estágio I / II. Níveis da enzima LDH duas vezes acima do valor normal (1000 UI), utilizados para estratificação prognóstica dos pacientes, foram observados em 12 dos 29 pacientes (Tabela 5). A presença do EBV, avaliada pela técnica de hibridização *in situ*, foi detectada em amostras tumorais de 6 pacientes, incluindo 1 paciente com linfoma associado à imunossupressão. Um total de 22 pacientes alcançou remissão completa e estão vivos sem evidência de doença, sendo considerados curados. Falha ao tratamento foi observada em 2 pacientes que apresentaram recidiva da doença durante o curso do tratamento. Entre esses 2 casos, 1 paciente evoluiu para o óbito. A tabela 5 mostra as características clínicas e biológicas dos pacientes no momento do diagnóstico do LNH-B.

Tabela 5 - Características clínicas e biológicas dos pacientes pediátricos e adultos jovens com LNH-B

Variáveis clínicas	Total (n=29)	LB (n= 27)	LDGCB (n=2)
Idade (anos)			
Mediana	9 (2 -19)	8 (2-19)	15 (13-17)
Sexo n (%)			
Masculino	22 (75%)	21 (77%)	1 (50%)
Feminino	7 (25%)	6 (23%)	1 (50%)
razão M/F	3.1/1		
Estágio n (%)			
I - II	8 (27%)	7 (25%)	1 (50%)
III - IV	21 (73%)	20 (75%)	1 (50%)
Imunossupressão			
HIV +	0	0	0
DLPT	1 (100%)	0	1(100%)
LDH*			
< 1000 UI	17 (58%)	15 (55%)	2 (100%)
> 1000 UI	12 (42%)	12 (45%)	0
EBER **			
Positivo	6 (20%)	5 (18%)	1(50%)
Negativo	23 (80%)	20 (82%)	1 (50%)
Follow-up[§]			
Óbito	4 (13%)	3 (11%)	1(50%)
Vivo	23 (84%)	22 (85%)	1(50%)
Vivo (R)	1 (3%)	1 (4%)	0

* Valores de referência 240 a 480 U/l ;

** EBER-ISH – técnica de hibridização *in situ* para detecção do EBV no tumor

ND = valor não disponível R = recaída LB = Linfoma de Burkitt

§ 2 pacientes tiveram perda de *Follow-up* LDGCB = Linfoma difuso de grandes células B

4.1.2 Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-B associado à AIDS

Participaram do estudo um total de 42 pacientes com diagnóstico de LNH-AIDS. O gênero masculino foi o mais freqüente entre os pacientes, com uma razão M/F de 3,6/1. A faixa etária variou entre 2 a 69 anos e a mediana da idade ao diagnóstico foi de 40,5 anos. O subtipo histológico predominante foi o LDGC-B diagnosticado em 33 dos 42 pacientes. Em apenas um paciente não foi possível estabelecer o diagnóstico do subtipo de LNH. Apesar de 25 pacientes apresentarem no momento do diagnóstico estágio avançado da doença (III / IV), apenas 14 dos 42 pacientes tiveram níveis elevados da enzima LDH. O índice de prognóstico internacional (IPI) com *score* 2 e 3 foi observado em 21 pacientes dos 36 casos em que a esta variável estava disponível para análise. Em 12 pacientes em que foi possível avaliar o *status* de imunossupressão avaliada pela contagem de células CD4, 5/12 casos apresentavam valores menores que 200 células/mm³. Devido à ausência de amostras tumorais disponíveis para realização técnica de hibridização *in situ*, considerada padrão ouro no diagnóstico de associação do vírus com o linfoma, este método não foi realizado em nosso estudo. A associação do EBV nos LNH-AIDS foi investigada por QPCR. O EBV foi detectado no plasma de 25 pacientes. A mediana do tempo de *follow-up* desses pacientes foi 43 meses. Entre os pacientes com seguimento completo (n=40) foram observados 27 casos de óbito, incluindo 4 pacientes que apresentaram recidiva durante o curso do tratamento (Tabela 6).

Tabela 6 - Características clínicas e biológicas dos pacientes com LNH-AIDS

Variáveis clínicas	Total (n = 42)	LB (n = 8)	LDGCB (n = 33)	NC (n= 1)
Idade (anos)				
Mediana	40 (2-69)	31 (2 - 43)	43 (13-69)	13
Sexo n (%)				
Masculino	33 (78,5%)	6 (75%)	28 (85%)	0
Feminino	9 (21,5%)	3 (25%)	5 (15%)	1 (100%)
razão M/F	3,6 /1			
Estágio				
I - II	16 (38%)	1 (12,5%)	15 (45%)	0
III - IV	25 (60%)	7 (87,5%)	17 (55%)	1 (100%)
ND	1 (2%)	0	0	0
LDH*				
< 500 UI	27 (64%)	1 (12,5%)	25 (75%)	1 (100%)
> 500 UI	14 (34%)	7 (87,5%)	7 (23%)	0
ND	1 (2%)	0	1 (2%)	0
IPI				
0 / 1	15 (36%)	1 (12,5%)	14 (44%)	0
2 / 3	21 (50%)	6 (75%)	15 (44%)	1 (100%)
ND	6 (14%)	1 (12,5%)	5 (12%)	0
CD4 (células/mm³)				
> 200	7 (16%)	1 (12,5%)	6 (18%)	0
< 200	5 (13%)	3 (37,5%)	2 (7%)	0
ND	30 (71%)	4 (50%)	25 (75%)	1 (100%)
QPCR /EBNA-1				
Positivo	25 (59%)	6 (75%)	18 (54%)	0
Negativo	17 (41%)	2 (25%)	15 (46%)	1 (100%)
Follow-up**				
Óbito	27 (64%)	6 (77,5%)	20 (60%)	1 (100%)
Vivo	11 (36%)	1 (12,5%)	10 (40%)	0

* Valores de referência 240 a 480 U/L

ND = valor não disponível NC = Não classificado LB = Linfoma de Burkitt

LDGCB = Linfoma difuso de grandes células B

** 4 pacientes tiveram perda de *follow-up*

4.2 Padronização da detecção e quantificação do DNA circulante no plasma de pacientes com LNH-B

4.2.1 Extração do DNA circulante em pacientes e controles

Amostras de plasma de um paciente previamente diagnosticado com LNH-B associado ao EBV e amostras de indivíduos saudáveis foram utilizadas para testar a eficiência de amplificação do DNA extraído do plasma. Inicialmente foi realizada uma reação de PCR convencional tendo como alvo o gene β -globina e o fragmento viral *EBNA-1*. Foi utilizado como controle positivo da reação, o DNA extraído da linhagem celular Namalwa, positiva para o vírus EBV. O DNA extraído do plasma de indivíduos saudáveis apresentou amplificação para o gene β -globina, porém não ocorreu amplificação para o fragmento viral *EBNA-1* nessas amostras. No entanto, o DNA de um paciente controle com LNH-B EBV positivo amplificou para dois alvos (Figura 4).

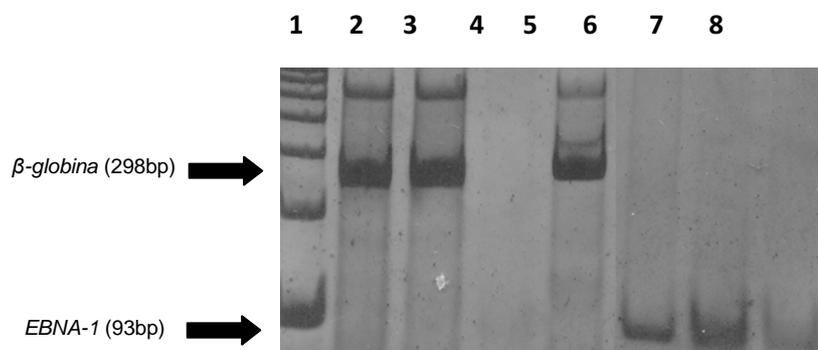


Figura 4 – Detecção do EBV por PCR. Amplificação do gene β -globina (298bp) e do fragmento do genoma viral *EBNA-1* (93bp) por PCR em amostras de indivíduos saudáveis e na amostra do paciente com LNH-B associado ao EBV. Gel de acrilamida – Bis acrilamida a 8%. **Linha 1**, marcador de peso molecular de 100 bp; **Linha 2**, linhagem Namalwa (β -globina); **Linha 3**, indivíduo saudável (β -globina); **Linha 4**, indivíduo saudável (*EBNA-1*); **Linha 5**, paciente (β -globina); **Linha 6**, paciente (*EBNA-1*); **Linhas 7 e 8**, linhagem Namalwa (*EBNA-1*)

4.2.2 Padronização da curva padrão para ensaio quantitativo por PCR em tempo real

Neste estudo, para quantificar os níveis de DNA total e do DNA do EBV livre no plasma foi utilizada uma curva padrão para os alvos gênicos β -globina e EBNA-1 presentes no DNA humano e viral, respectivamente. Ambos os ensaios obtiveram eficiência próxima de 100% ao detectar diluições seriadas do DNA extraído da linhagem celular Raji em 5 ordens de grandeza, variando entre 50.000 a 5 cópias/ μ L para o EBV (slope : -3.325; $r = 0,998$; eficiência = 99,7%), e 40.000 a 4 cópias/ μ L para o ensaio de β -globina (slope: - 3.570 e $r = 0,996$; eficiência = 85%) (Figura 5). A verificação da reprodutibilidade inter-ensaio da curva padrão do EBNA-1 e de β -globina foi realizada correlacionando o ciclo *Threshold* (CT) e o número inicial de cópias de cada diluição da curva. Esses dados foram obtidos através de curvas padrões realizadas em três dias distintos. De acordo com o teste de Pearson, houve correlação positiva entre para as curvas padrão do alvo EBNA-1, com valor de r próxima de 1 ($r = 0,995$, $p < 0,0001$; slope = -3.467). As curvas do gene β -globina realizadas nos três dias também foram estatisticamente correlacionadas ($r = 0,997$, $p < 0,0001$; slope = - 3.356) (Figura 6).

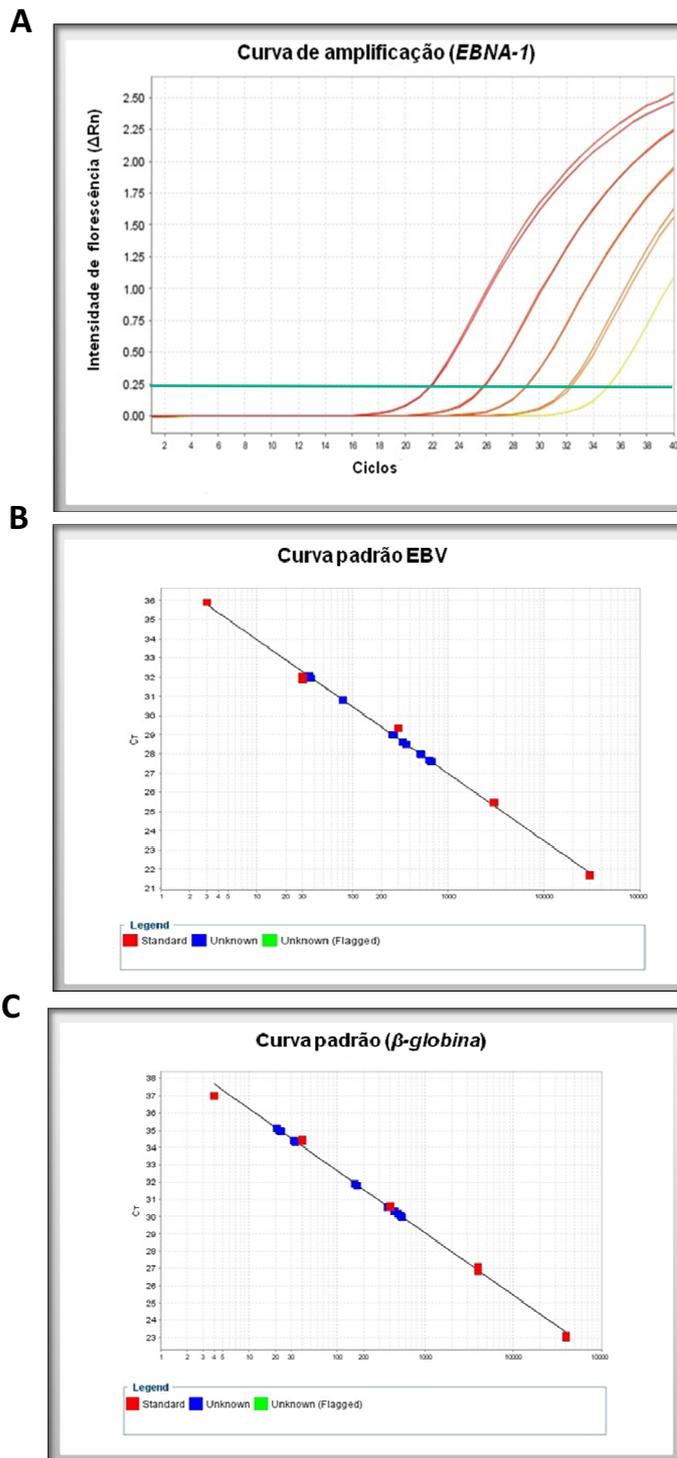


Figura 5 - Curva padrão relacionando o número de cópias das cinco ordens de grandeza em relação aos seus respectivos CT. (A) Figura representativa da curva de amplificação do fragmento do gene viral *EBNA-1* nas diluições seriadas do DNA da linhagem celular Raji. **(B)** Curva padrão para do gene *EBNA-1*. Coeficiente de correlação: 0,998, slope: $- 3.325$. **(C)** Curva padrão do gene *β-globina*. Coeficiente de correlação: 0,996, slope: $- 3.570$.

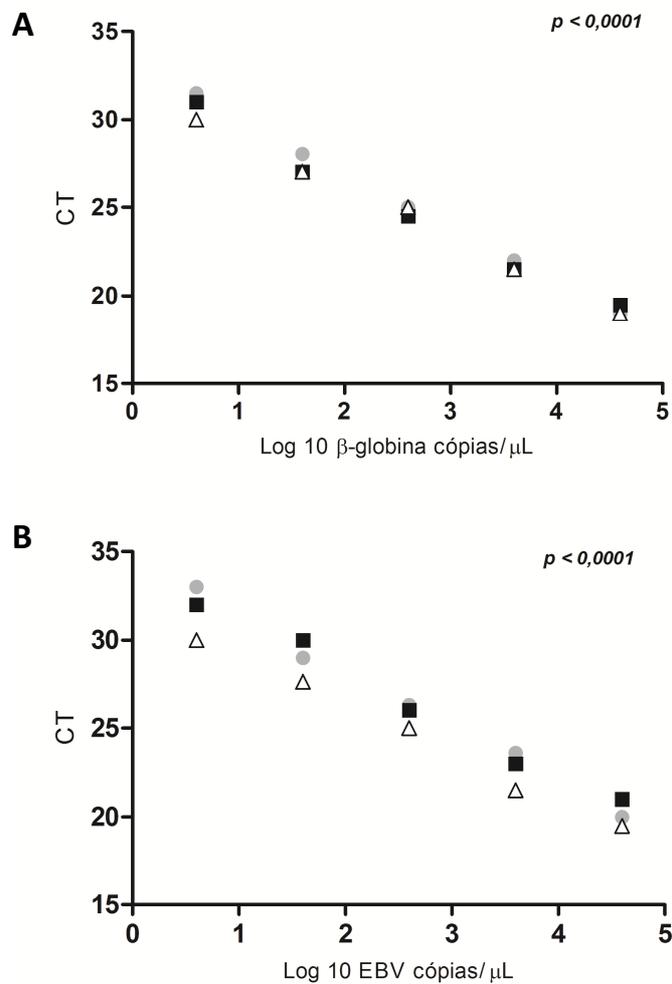


Figura 6 - Comparação inter-ensaio das curvas padrões. Comparação entre o número inicial de cópias, de cada diluição, e os CTs obtidos das curvas padrão construídas com o alvo viral e humano em 3 experimentos representativos realizados em dias diferentes. **(A)** De acordo com o teste correlação de Pearson, foi observada uma correlação significativa entre o CT e número inicial de cópias/ μ L de cada diluição das três curvas realizadas em dias diferentes tanto para o β -globina ($r = 0,997$, $p < 0,0001$; slope= -3.356) **(B)** como para EBV ($r = 0,995$, $p < 0,0001$; slope= -3.467)

4.3 Detecção do EBV no plasma e no tumor nos pacientes com LNH-B pediátricos

4.3.1 Comparação entre a detecção do EBV no plasma e em amostras tumorais

Para detecção da presença do vírus no plasma foi realizado um estudo cego que correlacionou as técnicas de hibridização *in situ*, método considerado padrão ouro para a detecção do vírus no tumor e a detecção do vírus no plasma por QPCR. Um total de 29 casos de pacientes com LNH-B participaram do estudo. Entre os 29 casos estudados, 6 foram EBV positivos no tumor e no plasma avaliados pelas técnicas de ISH e QPCR respectivamente. Adicionalmente, em todos os pacientes que foram EBV negativos no tumor também não foi detectada a presença do vírus no plasma. A associação entre os dois métodos de detecção no plasma e no tumor foi estatisticamente significativa com 100% de correlação. (coeficiente Kappa, $p = 1$). Além disso, o DNA do EBV não foi detectado em nenhum indivíduo saudável (Figura 7; Tabela 7 e 8).

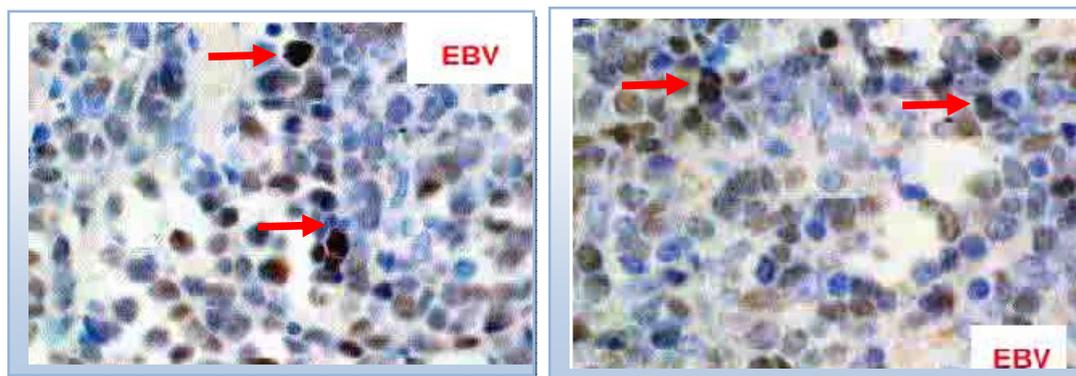


Figura 7 - Detecção do EBV em amostras tumorais de pacientes com LNH-B, utilizando a metodologia de hibridização *in situ*. As setas mostram a marcação do transcrito EBER-1 abundantemente presente no núcleo das células tumorais.

Tabela 7 - Comparação dos métodos de detecção do EBV por ISH e PCR em tempo real

Detecção do EBV			
Diagnóstico	ISH - EBER + (n = 29)	PCR tempo real + (n = 29)	
LB	5 (27)	5 (27)	p = 1 *
LDGC	1 (2)	1 (2)	

* Coeficiente Kappa

4.3.2 Quantificação da carga viral do EBV no plasma

No grupo de pacientes com LNH-B, 6 pacientes foram EBV positivos sendo observados números de cópias do vírus no plasma variando entre 23 e 3436 cópias e mediana de 1268 cópias/mL ao diagnóstico. Em todos os pacientes (23 casos) que tiveram diagnóstico negativo da associação da doença com EBV no tumor por hibridização *in situ*, além de 10 indivíduos controles negativos o EBV não foi detectado no plasma (Tabela 7 e 8).

4.3.3 Relação entre a concentração do DNA e o nível de LDH

Para avaliarmos se a quantificação da carga viral no plasma correlacionava-se com os níveis de LDH e o estágio da doença, utilizamos como ponto de corte níveis ≥ 1300 cópias do EBV/mL obtido através do cálculo da mediana do número de cópias no plasma dos pacientes LNH-B no momento do diagnóstico. O nível da LDH é o único parâmetro biológico disponível para a avaliação do prognóstico e resposta ao tratamento de pacientes com LNH-B da infância e adolescência. A presença de LDH acima de 2 vezes o valor normal

(1000 UI), e estágios III e IV estão relacionados com um pior prognóstico. A LDH acima de 1000 U/L e estágios III / IV foram encontrados em 2 e 4 pacientes respectivamente, do total de 6 pacientes. Devido ao pequeno número de casos não foi possível fazer nenhuma correlação entre a carga viral e LDH nesse grupo de pacientes.

4.3.4 Quantificação do DNA viral do EBV plasma durante o tratamento

Dos seis pacientes positivos para o EBV no plasma, cinco completaram o tratamento e um paciente ainda está em tratamento para recidiva (número de identificação 14). No momento do diagnóstico o número de cópias do EBV no plasma dos pacientes variou entre 23 e 3436, com mediana de 1268 cópias/mL. Os dados obtidos na quantificação do DNA ao diagnóstico e após o término do tratamento estão demonstrados na tabela 3. Uma observação relevante foi que após o primeiro ciclo de quimioterapia (QT) todos os pacientes apresentaram uma queda brusca na carga viral, chegando a níveis indetectáveis. Na maioria dos casos (5 casos) o DNA do EBV permaneceu indetectável no plasma durante o período de remissão, ao término e, 6 meses após do término do tratamento. A paciente N° 17 teve o diagnóstico de LNH-B após ser submetida a um transplante renal. A história clínica da paciente é descrita no Anexo 3. No momento do diagnóstico a carga viral no plasma era 3436 cópias/mL. Contudo, após o primeiro ciclo de QT e redução do regime de imunossupressão, a carga viral do EBV no plasma permaneceu indetectável durante e após 6 meses do término do tratamento (Figura 8). O paciente n° 14, que ao diagnóstico apresentava carga viral

de 2928 cópias/mL, teve recidiva da doença logo após o término do tratamento acompanhada da elevação do nível de EBV no plasma, que atingiu 6355 cópias. O paciente não atingiu nova remissão, e após 8 meses da recidiva ainda apresentava carga viral de 1450 cópias/mL (Figura 9).

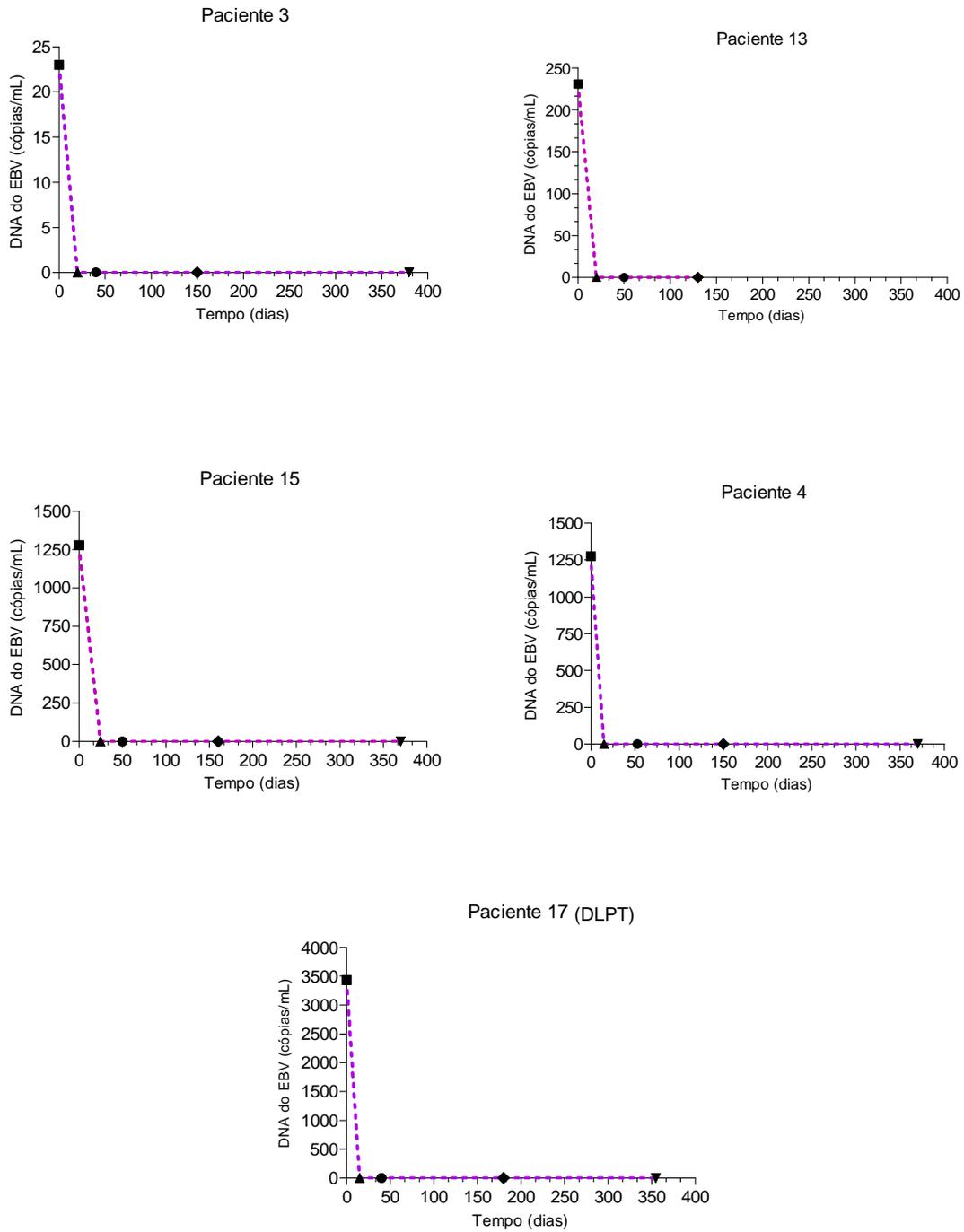


Figura 8 - Monitoramento da carga viral em pacientes com LNH-B associado ao EBV durante o tratamento. (■) Ao diagnóstico; (▲) Após 1º ciclo de QT; (●) Remissão; (◆) Término do tratamento; (▼) Seis meses após o término do tratamento.

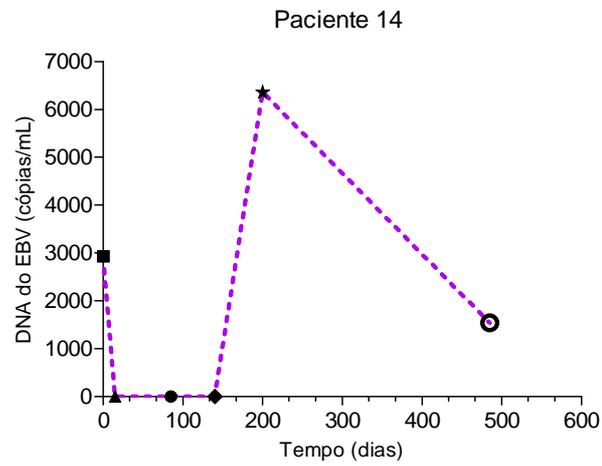


Figura 9 – Perfil de resposta do paciente com LNH-B associado ao EBV que apresentou recidiva durante tratamento. (■) Ao diagnóstico; (▲) Após 1º ciclo de QT; (●) Remissão; (◆) Após término do tratamento (★) Recidiva; (○) Progressão de doença.

Tabela 8 - Quantificação do DNA total e do EBV por QPCR no plasma

Pacientes LNH-B (n=29)	
DNA total (cópias/mL) mediana (variação)	
Diagnóstico	1541 (34 - 190000)
Durante o tratamento [§]	653 (12 - 50881)
Após o tratamento [#]	93 (12 - 7142)
Controles (n = 10)	38 (13 - 151)
DNA EBV (cópias/mL) mediana (variação)	
Diagnóstico (n = 6)	1258 (23 - 3436)
Após tratamento (n = 6)	0
Recidiva (n = 1)	3902 (1450 - 6355)
Controles (n = 10)	0

[§] Durante o tratamento foram avaliados 14 pacientes

[#] Após o tratamento foram avaliados 17 pacientes

4.3.5 Quantificação de β -globina na avaliação do DNA total no plasma de pacientes LNH-B pediátricos e adultos jovens

Os níveis de β -globina avaliados no plasma de 29 pacientes com LNH-B tiveram uma variação entre 17 a 190185 cópias/mL de β -globina com mediana de 1541 cópias/mL ao diagnóstico. Durante o tratamento os níveis de DNA variaram de 12,17 a 50881, com mediana de 653,39 cópias/ mL. Após o tratamento a variação foi de 12 a 7142, e mediana de 93 cópias/mL. Alguns pacientes não foram avaliados em todos os pontos devido à impossibilidade prévia de coleta da amostra, ou ausência de plasma para extração de DNA (Tabela 8). Entre os

controles saudáveis os níveis *β-globina* variaram entre 13 e 151 cópias, com mediana de 38,71 cópias/mL de plasma.

Quando os momentos do segmento do tratamento foram comparados entre si, a análise estatística revelou que os níveis de DNA total nos pacientes ao diagnóstico e durante o tratamento foram significativamente distintos daqueles encontrados no grupo controle ($p < 0,001$; $p = 0,001$). No entanto, não houve diferença entre os níveis apresentados ao diagnóstico e durante o tratamento ($p = 0,58$). Tanto o nível de DNA dos pacientes no momento do diagnóstico quanto os níveis durante o tratamento foram diferentes quando comparados ao término do tratamento ($p = 0,008$; $p = 0,03$), respectivamente. Não houve diferença entre os níveis de DNA dos pacientes tratados e o grupo controle ($p = 0,13$), (Figura 10).

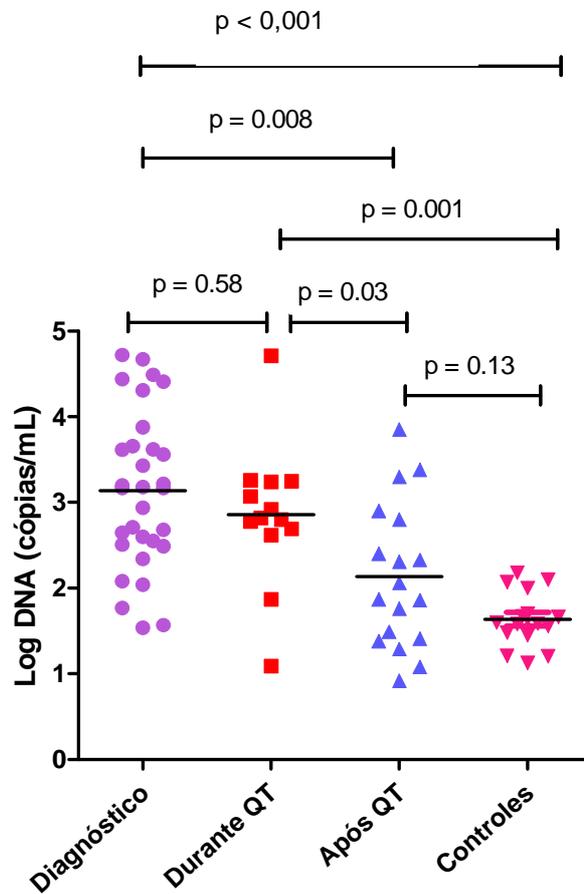


Figura 10 - Quantificação do DNA total no plasma dos pacientes LNH-B. A análise dos níveis de DNA total foi realizada em 3 momentos diferentes e comparada aos níveis dos controles. A linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Comparação entre os grupos realizada pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

4.3.6 Análise da sensibilidade e especificidade da quantificação do DNA circulante total

A curva ROC foi realizada para obtenção de um de um ponto de corte capaz de discriminar indivíduos saudáveis de pacientes com LNH-B de acordo com a concentração de DNA no plasma. O *cut-off* de melhor poder discriminativo foi 46 cópias/mL, no qual a área da curva ROC foi 0.74 com sensibilidade de 80% (CI 0,44 – 0,97) e especificidade de 72% (CI 0,52 - 0,87) (Figura 11).

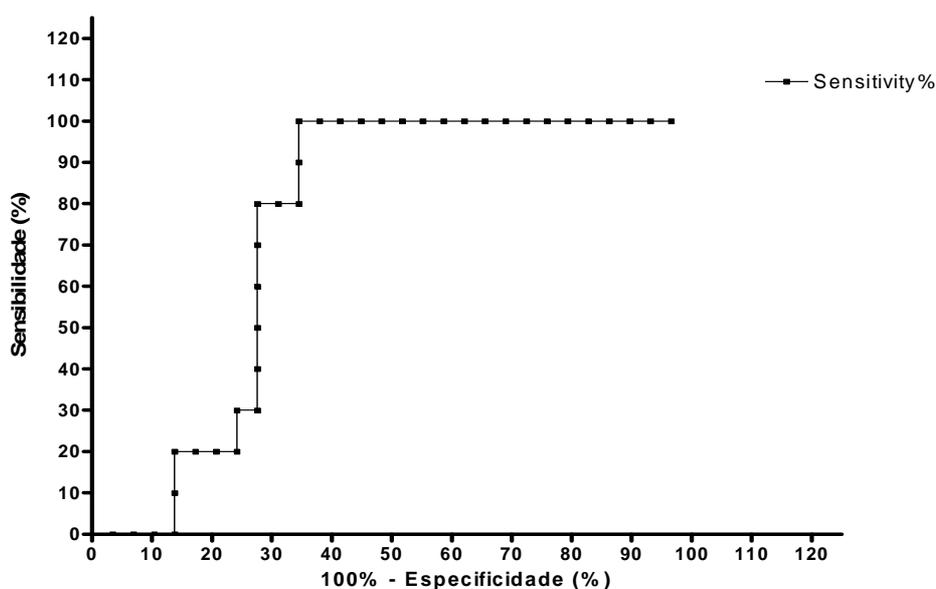


Figura 11 –. Análise da sensibilidade e especificidade da quantificação do DNA total no plasma pela curva *Receiver operating characteristic* (ROC). Cada ponto na curva representa um ponto de corte discriminativos entre pacientes e indivíduos saudáveis. Os valores indicados nos eixos X e Y estão expressos em porcentagens.

4.3.7 Quantificação do DNA total livre no plasma durante o tratamento

A quantificação de β -globina foi utilizada para avaliar a resposta ao tratamento dos pacientes com LNH-B (Tabela 8). Para realização dessa avaliação foram escolhidos três pontos do seguimento do tratamento: ao diagnóstico, remissão e após o término do tratamento. Dos 29 pacientes com LNH-B, 11 tiveram avaliação até o término do tratamento. A presença de um perfil de resposta ao tratamento foi observado em 6 casos que apresentam uma queda significativa das concentrações de DNA total na remissão e após o término do tratamento. No entanto, em um caso (número de identificação 4) houve um aumento da concentração de DNA durante a remissão e, após o tratamento, o nível de DNA foi mais baixo que o observado no momento do diagnóstico (Figura 12).

O aumento ou a não alteração da concentração DNA durante a remissão foi observado em 4 casos, entre esses, em 3 pacientes, não ocorreu falha ao tratamento. Contudo, o paciente 9 apesar de ter apresentado baixos níveis de DNA ao diagnóstico e na remissão, apresentou após o tratamento aumento dos níveis do DNA total no plasma correlacionado com o diagnóstico de doença em progressão. Este paciente durante o curso do tratamento de resgate evoluiu para óbito (Figura 13).

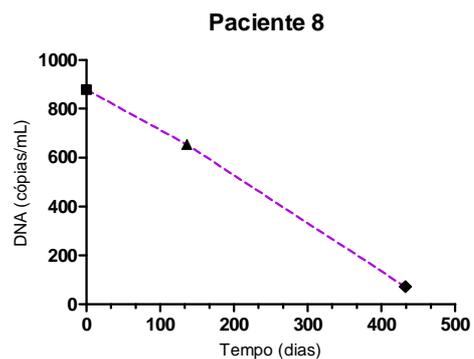
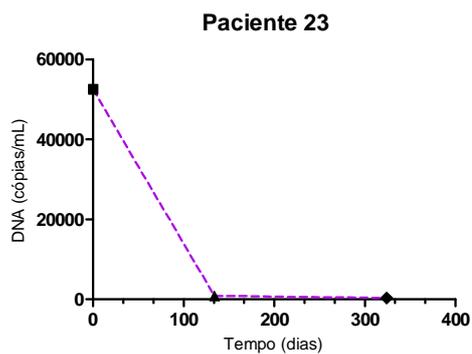
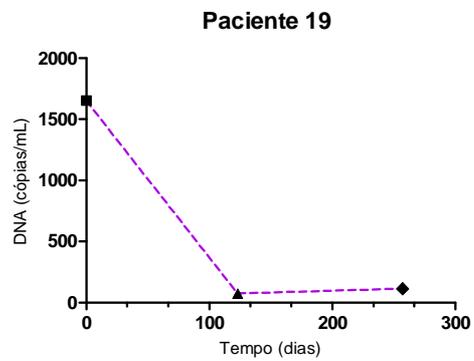
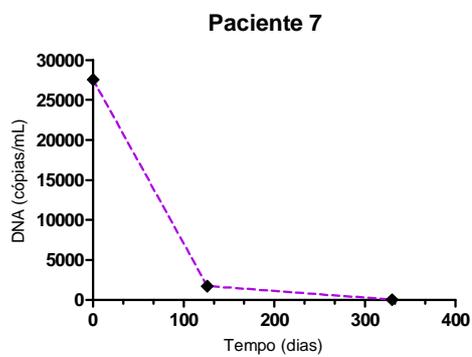
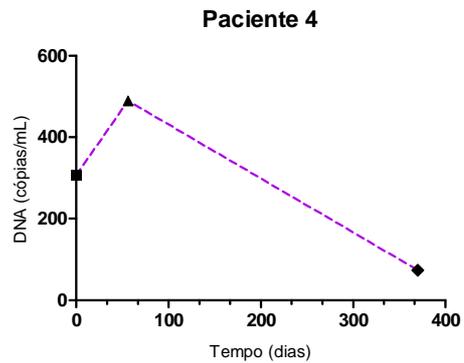
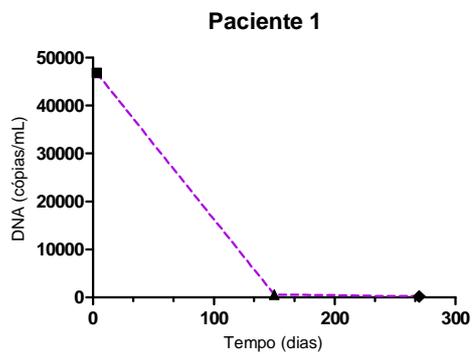


Figura 12 – Monitoramento do DNA total no plasma durante o tratamento de pacientes com LNH-B. (■) Ao diagnóstico; (▲) Remissão; (◆) Após o término do tratamento.

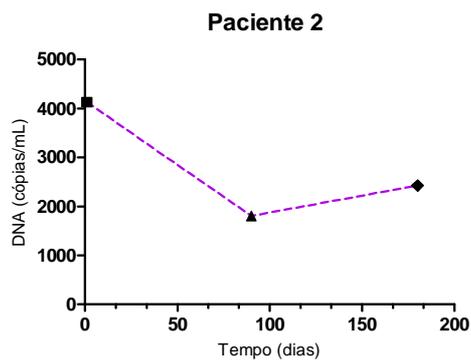
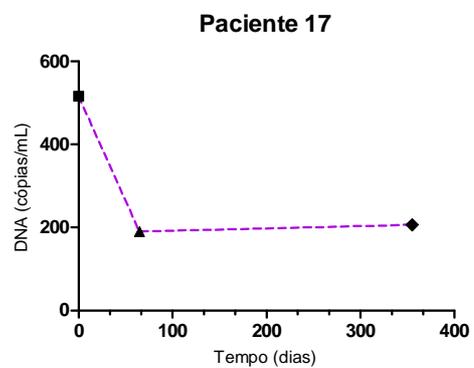
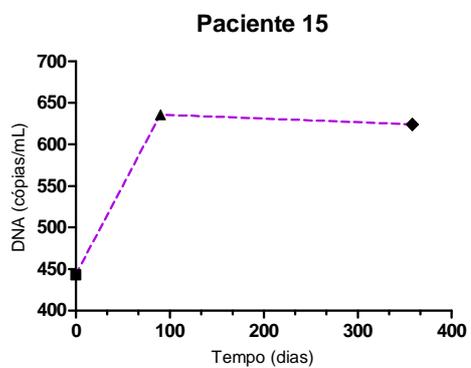
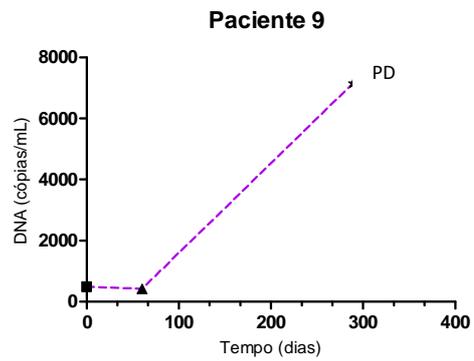
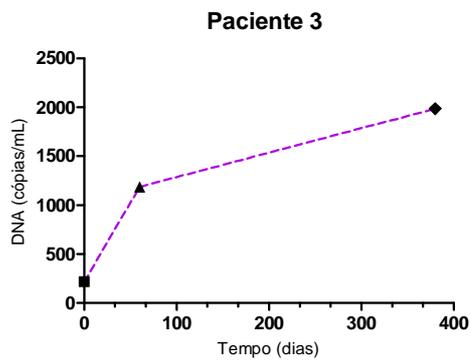


Figura 13 – Monitoramento do DNA total no plasma durante o tratamento dos pacientes com LNH-B. (■) Ao diagnóstico; (▲) Remissão; (◆) Após o término do tratamento; (★) Progressão de doença (PD).

4.4 Detecção e quantificação do EBV no plasma dos pacientes com LNH associado ao HIV

Entre os 42 pacientes com LNH-AIDS, a associação da doença com o vírus foi avaliada quase que exclusivamente no plasma por QPCR. Em um caso o EBV pode ser detectado também no tumor por hibridização *in situ* (dado não mostrado). O EBV no plasma foi observado em 25/42 casos. Esses pacientes apresentaram carga viral variando entre 17 a 52.000 cópias/mL com mediana de 1300 cópias/mL de plasma. O EBV não foi detectado no plasma dos indivíduos controles (Tabela 9).

Tabela 9 - Quantificação do EBV por QPCR no plasma dos pacientes com LNH-AIDS

Pacientes com LNH-AIDS		<i>DNA Total (cópias/mL)</i>
<i>EBV - QPCR</i>	<i>n (%)</i>	<i>Mediana (variação)</i>
Positivo	n = 25 (59%)	1300 (17 - 52000)
Negativo	n = 17 (41%)	0
Controles	n = 10 (100%)	0

4.4.1 Comparação entre os níveis de DNA do EBV no plasma dos pacientes com LNH-B imunocompetentes e LNH-AIDS

Uma análise realizada entre os pacientes com LNH-B imunocompetentes e com LNH-AIDS revelou que não houve diferença entre as medianas dos níveis de DNA do EBV no plasma dos dois grupos de pacientes, no momento do diagnóstico ($p = 0,5$) (Figura 14).

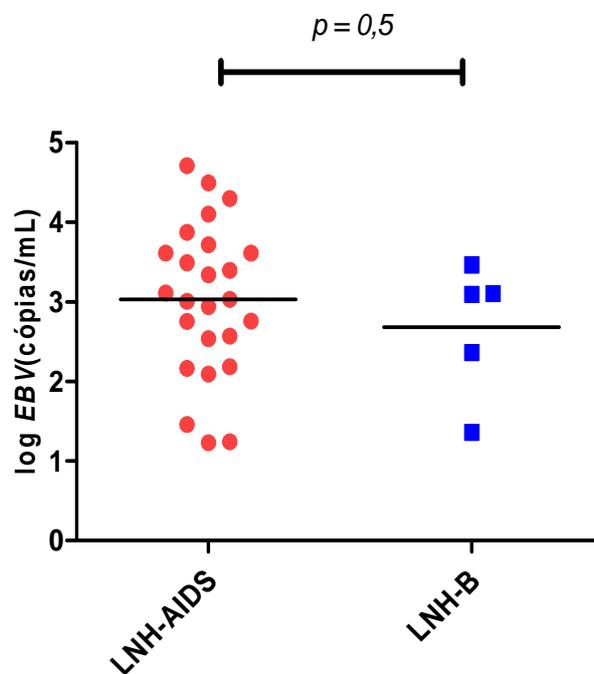


Figura 14 - Quantificação do EBV ao diagnóstico no plasma de pacientes com LNH-B, LNH-AIDS. A linha horizontal representa a mediana de cada grupo. Comparação entre os grupos realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

4.4.2 Impacto das variáveis clínicas e biológicas no prognóstico de pacientes LNH-AIDS

Para avaliar o impacto das variáveis clínicas na probabilidade de sobrevivência global (pSG) dos pacientes LNH-AIDS foi realizada curva de Kaplan-Meier (figura 10). As curvas foram comparadas utilizando o teste Log-rank com valor $p < 0,05$ sendo estatisticamente significativo. Neste contexto, os 42 pacientes desta coorte apresentaram uma probabilidade de SG de 34% pacientes vivos em aproximadamente 2 anos (Figura 15 A). Adicionalmente, avaliamos também o impacto do estágio e do índice prognóstico internacional (IPI) ao diagnóstico na pSG. Os estágios III / IV (avançado) e IPI com score 2 e 3 (alto risco) estavam relacionados com um pior prognóstico nos pacientes LNH-ADS. As duas variáveis foram capazes de influenciar negativamente no prognóstico dos pacientes. Os pacientes que tinham IPI com score 2 e 3 apresentaram uma pSG menor (apenas 15 % em 2 anos) que os pacientes com IPI de baixo risco (Log-rank $p = 0,002$). Quanto ao estágio, os pacientes com doença avançada ao diagnóstico apresentaram um a pSG de apenas 18% em 6 anos (Log-rank $p = 0,001$) (Figura 15 B e C).

Ao avaliar se a presença do DNA do EBV no plasma tinha impacto na pSG, foi observado que embora os 25 pacientes EBV positivos tivessem apresentado uma pSG menor (31% vivos em 2 anos) do que os negativos, não houve diferença estatística entre as curvas (Log-rank = 0,10) (Figura 15 D).

Para avaliar se o número de cópias tinha relação com a pSG foi utilizado como ponto de corte níveis do EBV no plasma ≥ 1300 cópias/mL. O ponto de corte foi obtido através da mediana do número de cópias do EBV no plasma dos pacientes com LNH-B no momento do diagnóstico. Pacientes com concentração de DNA ≥ 1300 cópias/mL tiveram pSG de 28% em 2 anos, significativamente menor quando comparada aos pacientes com concentração de DNA $<$ que 1300 cópias/mL (pSG = 52% em 2 anos) (Log-rank $p = 0,003$) (Figura 15 E).

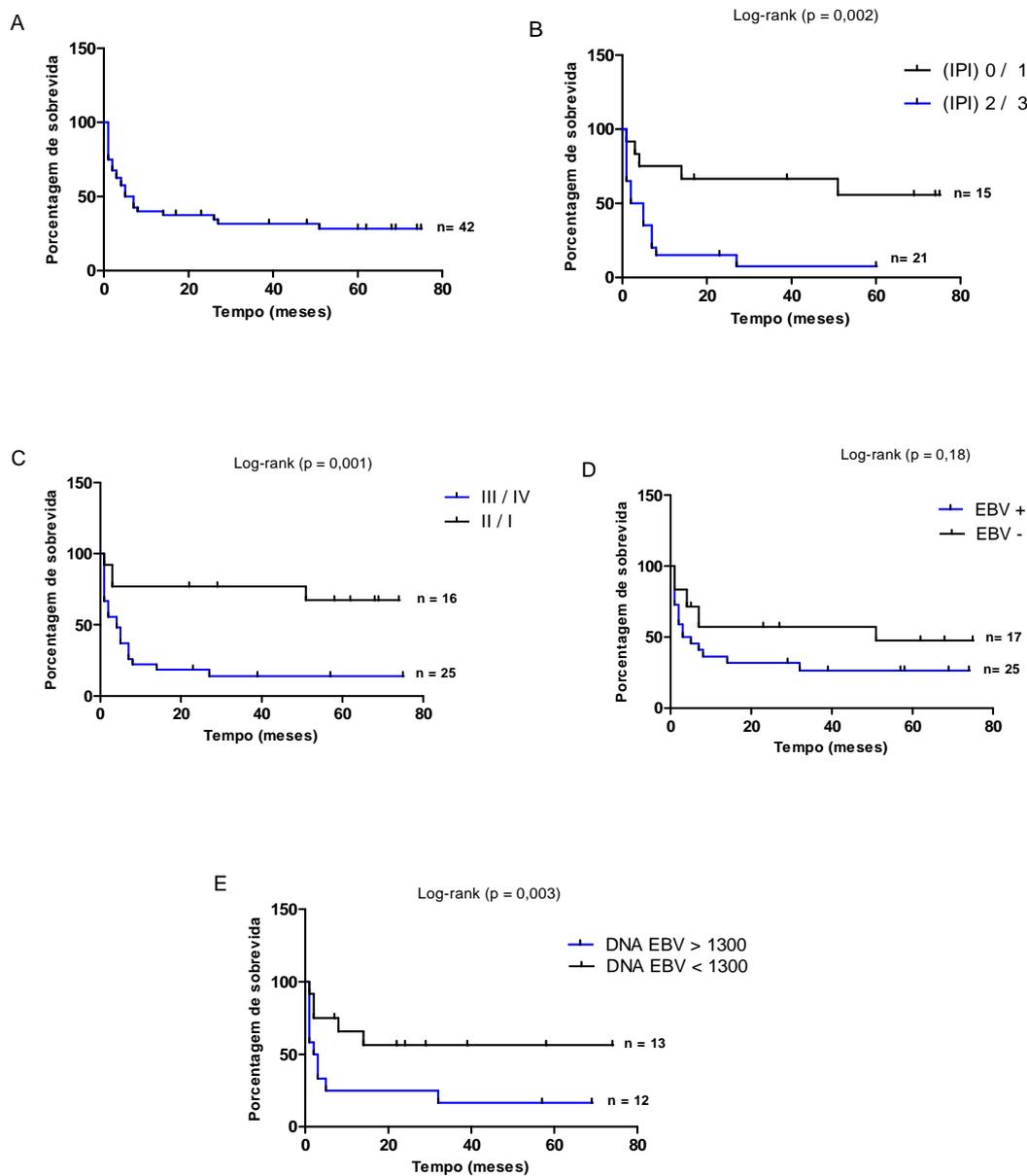


Figura 15. Curvas de Kaplan-Meier para avaliação da sobrevida dos pacientes com LNH-AIDS. (A) Probabilidade de Sobrevida Global do grupo de pacientes com LNH-AIDS. **(B)** pSG em relação ao IPI **(C)** pSG de acordo com o estágio **(D)** pSG em relação ao *status* do EBV no plasma. **(E)** pSG avaliada de acordo com os níveis de DNA do EBV no plasma (≥ 1300 cópias/mL, N = 12; < 1300 cópias/mL, N = 13).

5 DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta há aproximadamente 60 anos, o DNA circulante tem sido detectado no plasma ou soro de indivíduos saudáveis, e também em pacientes com diferentes patologias, incluindo neoplasias (MANDEL *et al*, 1948). No plasma de pacientes com câncer, o DNA específico do tumor pode coexistir com DNA circulante originado de células normais. A maioria do DNA livre no plasma é originada do tumor e existem relatos da correlação entre a carga tumoral e a concentração de DNA circulante detectado no plasma. Assim, a análise do DNA livre no plasma ou soro tem sido proposta em diversos estudos baseados na quantificação do DNA total (normal e tumoral) detectando alvos endógenos (β -globina, *GAPDH*, β -actina), DNA específico do tumor utilizando características como alterações genéticas e epigenéticas, ou mesmo, através da detecção de alvos virais (EBV) (LEON *et al*, 1977, JAHR *et al*, 2001; FLESCHHACKER *et al*, 2007).

Neste estudo, foi utilizado o DNA circulante no plasma como um marcador de diagnóstico, avaliação de resposta ao tratamento, e prognóstico. Foram analisadas duas coortes diferentes formadas por pacientes imunocompetentes com diagnóstico de LNH-B e pacientes com diagnóstico de LNH-AIDS. Para isso, realizamos ensaios quantitativos de PCR em tempo real para detectar tanto o DNA total como DNA específico do tumor, utilizando os alvos β -globina e o fragmento do genoma viral *EBNA-1*, respectivamente. O QPCR tem sido aplicado em diversos estudos para quantificação do DNA circulante em neoplasias, doenças

não neoplásicas e, até mesmo, em condições de *stress* fisiológico (FLESCHHACKER *et al*, 2007; TONG *et al*, 2006).

Na quantificação absoluta por QPCR é necessária a construção de curvas padrões, as quais servem para estimar a concentração de um alvo presente no DNA em uma determinada amostra. A eficiência da curva padrão é determinante para a reprodutibilidade e precisão da quantificação realizada por esse método. Na literatura há relatos de que alguns fatores como o protocolo para a extração do DNA e a seqüência dos oligonucleotídios podem influenciar a eficiência da curva padrão e, conseqüentemente, a quantificação do alvo (HEID *et al*, 1996 ; HAYDEN *et al*, 2008). Neste contexto, os ensaios de quantificação do DNA total e viral no plasma presentes no nosso estudo, foram avaliados quanto à reprodutibilidade e eficiência das curvas padrões. Quando as curvas padrões de ensaios realizados em três dias diferentes foram comparadas através da avaliação do CT e do número de cópias correspondentes a cada diluição de DNA utilizado na construção das curvas padrões, os resultados obtidos mostraram que ambos os ensaios foram reprodutíveis e bastante eficientes, uma vez que não houve diferença estatística entre as curvas dos dois alvos (*β-globina* $p < 0,0001$; EBNA-1 $p < 0,0001$). Além disso, foi possível observar para as curvas padrões dos dois alvos um coeficiente de correlação próximo de 1 (*β-globina*, $r = 0,997$; EBNA-1, $r = 0,995$), e eficiências próximas de 100%, determinadas pela média da inclinação das curvas de cada alvo. (*β-globina*, $slope = -3.356$; EBNA-1, $slope = -3.467$).

Como mencionado anteriormente, o gene *β-globina* foi utilizado como alvo para a quantificação do DNA total no plasma de pacientes com diagnóstico de

LNH-B. Este alvo tem sido utilizado em diferentes estudos de quantificação do DNA total como um marcador de diagnóstico e prognóstico de doenças neoplásicas e não neoplásicas (HUANG *et al*, 2006; FOX *et al*, 2008; LAM *et al*, 2003). Recentemente, um estudo relatou os resultados da avaliação dos níveis de DNA total no plasma de pacientes com câncer de ovário ao diagnóstico, quantificando três diferentes alvos endógenos incluindo *β-globina*. Os níveis de DNA total no plasma dos pacientes foram superiores quando comparados aos encontrados nos indivíduos saudáveis, sendo este resultado observado nos três alvos avaliados. No entanto, por ter obtido melhor eficiência de amplificação com o gene *β-globina*, este foi considerado o melhor alvo pelos autores (KAMAT *et al*, 2006). O estudo de Hohaus e colaboradores é um dos poucos estudos de quantificação do DNA total no plasma de pacientes com linfomas, incluindo LNH. Neste estudo, os autores avaliaram o plasma de 142 pacientes também utilizando como alvo *β-globina*. Além dos pacientes possuírem níveis elevados de DNA no plasma em relação ao controle, foi observado que a concentração de DNA no plasma tinha um impacto no tempo de sobrevida dos pacientes, e que estava correlacionada com os fatores de prognóstico adverso como níveis da enzima LDH elevados e estágio avançado da doença. A associação dos níveis de DNA total no plasma com fatores prognósticos como LDH e estágio também tem sido relatada no câncer de pulmão e de mama (GAUTSCHI *et al*, 2004, SILVA *et al*, 2002). No entanto, a utilização do DNA total para avaliação da sobrevida de pacientes portadores de alguns tipos de câncer, como o de pulmão, parece controversa sendo considerado um pobre marcador de prognóstico (GAUTSCHI, 2004). Na análise de nossos pacientes, os resultados obtidos na quantificação do DNA total

no plasma mostraram que a mediana dos níveis de DNA no plasma dos pacientes no momento do diagnóstico é significativamente maior quando comparada a dos indivíduos saudáveis (1541 cópias/mL *versus* 38 cópias/mL; $p < 0,001$). Além disso, na análise da curva ROC através da concentração de DNA total no plasma mostrou que um ponto de corte de 46 cópias/mL foi o de melhor poder discriminativo entre pacientes e indivíduos saudáveis com eficiência de 72% e sensibilidade de 80%. Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre a concentração de DNA no plasma com os níveis de LDH e estágio, no momento do diagnóstico. Apesar disto, dos 29 pacientes incluídos no estudo na coorte de pacientes imunocompetentes com LNH-B, 13 casos apresentavam LDH >1000 UI e, 21 pacientes com estágio III/IV apresentavam níveis de DNA acima de 2 vezes a mediana da concentração de DNA encontrada nos controles. Devido a eficácia do tratamento, somente 3 pacientes não obtiveram resposta, não sendo também possível correlacionar a quantificação do DNA com o tempo de sobrevivência dos pacientes com LNH-B.

Desde a primeira aplicação clínica do DNA circulante realizada há aproximadamente 40 anos por Leon e colaboradores, tem sido relatado que esta característica pode ser utilizada como um marcador de resposta ao tratamento tanto quimioterápico quanto radioterápico nos pacientes com diferentes tipos de neoplasias. Nestes estudos, o perfil de resposta ao tratamento estava relacionado à queda da concentração de DNA circulante no plasma após o término do tratamento. Contudo, quando a concentração de DNA no plasma não se altera, ou há um aumento dos níveis de DNA durante o curso do tratamento, esta observação é sugestiva de refratariedade à terapia. (LEON *et al*, 1977; SOZZI *et*

al, 2003; GAUTSCHI *et al*, 2004). Nossos resultados estão de acordo com a literatura, pois os pacientes não só ao diagnóstico (mediana = 1541 cópias/mL), como também durante o tratamento (mediana = 653 cópias/mL) apresentaram uma concentração de DNA bastante superior aos indivíduos saudáveis (mediana = 38 cópias/mL). A análise estatística mostrou que essa diferença era significativa ($p < 0,001$). Curiosamente, apesar da mediana do grupo de pacientes durante o tratamento ter sido menor quando comparada ao diagnóstico, esses dois grupos não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,58$). Por outro lado, A comparação das medianas dos pacientes após o tratamento com aquela dos indivíduos saudáveis não demonstrou uma diferença estatística significativa ($p=0,13$), evidenciando que a concentração de DNA circulante dos pacientes ao final do tratamento comporta-se de forma similar a dos indivíduos normais. Além disso, os resultados obtidos mostram que há uma relação entre a carga tumoral e concentração de DNA no plasma. Quando 11 pacientes tiveram o curso do tratamento monitorado individualmente através dos níveis de DNA total, 6 apresentaram queda significativa da concentração de DNA no plasma após o tratamento, mostrando um perfil sugestivo de resposta. Nenhum desses casos apresentou recidiva da doença, e ao término do tratamento esses pacientes foram considerados curados (Figura 8). No entanto, um paciente que no momento do diagnóstico e durante o tratamento apresentava níveis baixos de DNA, evoluiu com progressão de doença logo após o término do tratamento, acompanhada de aumento da concentração de DNA no plasma (Paciente 9; Figura 12). De forma surpreendente, em 4 pacientes que durante todo follow-up e término do tratamento não foi detectada falha de resposta, foi observado um aumento do DNA no

plasma, tanto no momento da remissão, como no término do tratamento. Apesar de termos feito uma análise aprofundada dos prontuários médicos na busca de eventos clínicos que pudessem estar relacionados a este perfil, não detectamos alterações do quadro clínico destes pacientes que permitissem aventar alguma hipótese para responder tal questão.

Schwarz e colaboradores ao analisarem as concentrações de DNA circulante em crianças com leucemia linfoblástica aguda observaram que o nível de DNA total circulante diminuía após o início do tratamento e que esta redução acompanhava o declínio do número de leucócitos no sangue periférico. Estes autores, neste estudo observaram também pequenos aumentos da concentração de DNA durante o período de remissão o que atribuíram à intensa atividade de regeneração da medula óssea nesta situação. Esta hipótese não pode ser totalmente descartada em nossos pacientes com elevação da concentração de DNA durante o tratamento. Em virtude da característica do tratamento do LNH-B na infância em que ciclos intensivos de quimioterapia são administrados em intervalos curtos, a medula óssea está em ativa regeneração entre os ciclos. O tempo exato em que ocorre este fenômeno é difícil de precisar só pela contagem de leucócitos de forma que a elevação da concentração de DNA nesses pacientes poderia estar refletindo o fenômeno de regeneração (SCHWARZ *et al*, 2009).

Outros estudos também relataram que alguns pacientes não apresentam queda do número de cópias do DNA circulante após o tratamento (GAUTSCHI *et al*, 2004). Há inclusive, relatos de que ocorre elevação dos níveis de DNA no plasma em patologias não neoplásicas relacionadas com intenso quadro de injúria

celular como inflamação, hemorragia, traumas cardíacos ou cerebrais (BUTT *et al*, 2008). Em estudo recente, Fox e colaboradores mostraram que durante o evento febril, o qual é marcado por causar intensa injúria tecidual, há um aumento de DNA total no plasma em menos de 24 após o evento. Estes autores também mostraram que níveis elevados de DNA no plasma podem permanecer até 10 dias após do evento de febre (FOX *et al*, 2008).

Em nosso estudo, os 4 casos com resultados do monitoramento do DNA total circulante que apresentaram resultados conflitantes, apontam a necessidade da avaliação de um maior número de casos e de *time points* durante o tratamento. Embora estes resultados ainda necessitem investigação, na nossa análise, a quantificação do DNA total foi eficiente em detectar um caso de falha ao tratamento e, além disso, permitiu distinguir pacientes que após o tratamento foram considerados curados, pois não apresentaram recidiva da doença durante o tempo de acompanhamento do estudo. Deste modo, a quantificação do DNA total no plasma de pacientes com LNH-B pode ser uma ferramenta útil para avaliação da carga tumoral e no monitoramento da resposta ao tratamento. Estes resultados, embora promissores, têm algumas limitações. Nesta série de pacientes não foi possível fazer correlações entre a concentração de DNA total com o estágio da doença e níveis de LDH, principais fatores utilizados na clínica para avaliação de prognóstico dos pacientes LNH-B. Isto em parte, pode ser atribuído ao número reduzido de pacientes. Por outro lado, até o presente momento não há na literatura parâmetros pré-definidos quanto aos melhores alvos, compartimento do sangue, concentração definidora de prognóstico e, até mesmo, a unidade de quantificação de DNA no plasma. Não obstante todas as dificuldades, o interesse

na utilização do DNA circulante no plasma como um biomarcador está crescendo rapidamente uma vez que é um método não invasivo e que pode gerar um rápido resultado, com aplicabilidade em várias doenças e, principalmente, na detecção e no monitoramento do câncer (FLESCHHACKER *et al*, 2007).

Os fragmentos de genes endógenos liberados pelas células tumorais no plasma não são uma característica específica, uma vez que qualquer célula que esteja em processo de morte pode liberá-los. Embora esta característica tenha sido objeto de diversos estudos, inclusive o nosso, nós avaliamos além do DNA total, uma característica inerente ao tumor. Entre os 29 pacientes com LNH-B, o subtipo histológico predominante foi o LB, com alguns raros casos de LDGCB. No LB a principal alteração genética é uma translocação recíproca entre os cromossomos 8 e 14 e suas variantes, onde se localizam os loci dos genes *MYC* e das imunoglobulinas. O ponto de quebra no cromossomo 8 pode ocorrer acima ou dentro do gene *MYC*. No cromossomo 14 os pontos de quebra podem estar dentro ou adjacentes as regiões *switch*, variáveis (V), diversidade (D) e junção (J) do gene da imunoglobulina. Recentemente, Frickenhofen e colaboradores detectaram o rearranjo clonal da cadeia pesada da imunoglobulina originada do tumor no plasma de pacientes com LNH pela técnica de PCR. Apesar da translocação t 8;14 ser específica das células do LB, tecnicamente, a quantificação desses alvos torna a detecção inviável, a medida que cada paciente pode possuir translocações com pontos de quebra, ou rearranjos da imunoglobulinas diferentes (SHIRAMIZU *et al*, 1991; FRICKHOFEN *et al*, 1997).

Além das características listadas acima, as células tumorais dos pacientes com LB podem apresentar o EBV. Em estudos recentes foi relatada uma alta frequência de associação do EBV nos tumores de pacientes brasileiros com LB (HASSAN *et al*, 2008, QUEIROGA *et al*, 2008 A e B). Desta forma, as células tumorais podem liberar DNA do vírus para o plasma e esta característica já vem sendo utilizado como um biomarcador de diagnóstico, prognóstico e de resposta ao tratamento de pacientes com neoplasias associadas ao EBV (AU *et al*, 2004; FAN *et al*, 2006; LEI *et al*, 2002; GANDHI *et al*, 2006; CHAN *et al*, 2003).

No presente estudo foi monitorado o curso do tratamento utilizando a quantificação do DNA do EBV livre no plasma de pacientes com LNH-B. O EBNA-1 foi escolhido devido à excelente eficiência de amplificação mostrada em um estudo prévio (RYAN *et al*, 2004). Estudos recentes que avaliaram a detecção do EBV em amostras pareadas de plasma por QPCR, e tumor pela técnica de hibridização *in situ* mostraram que há uma concordância entre resultados obtidos pelos dois métodos (RYAN *et al*, 2004; FAN *et al*, 2006). À semelhança dos estudos prévios, em nosso estudo cujo desenho foi cego para os dois métodos, foi mostrada uma correlação positiva. Dos 29 pacientes avaliados, 6 foram positivos e 23 negativos para ambos os métodos. Nenhum dos 10 indivíduos controles que participaram do estudo apresentou EBV detectável no plasma por QPCR. Estes resultados sugerem uma alta sensibilidade da técnica de QPCR no diagnóstico do vírus no plasma. Desta forma, este método de detecção do EBV no plasma pode ser, num futuro próximo, uma ferramenta prática para o diagnóstico dos LNH-B associados ao EBV.

Adicionalmente ao valor da detecção no diagnóstico, em algumas neoplasias classicamente associadas ao EBV como o carcinoma de nasofaringe, LH e LNH, LNH-AIDS e DLPT este vírus vem sendo alvo para o estudo do monitoramento da resposta ao tratamento (FAN *et al*, 2006, GANDHI *et al*, 2004; LIN *et al*, 2004; TSAI *et al*, 2008). No carcinoma de nasofaringe, neoplasia que exhibe alta associação com EBV, a concentração do vírus no plasma tem sido referida como um bom marcador molecular para o monitoramento da resposta ao tratamento (LIN *et al*, 2004).

A literatura é escassa no que concerne ao monitoramento da carga viral do EBV no plasma em relação à resposta ao tratamento de pacientes com LNH-B pediátricos. No entanto, recentemente Lei e colaboradores estudaram uma série de pacientes com LNH, incluindo LB. Neste estudo foi mostrado que a queda do número de cópias do EBV no plasma, após o 1º ciclo de QT estava associada com a resposta ao tratamento. De acordo com este e outros estudos que utilizaram o vírus como marcador de resposta em pacientes com neoplasias associadas ao EBV, a queda precoce do número de cópias após o primeiro ciclo de QT está relacionada a uma boa resposta ao tratamento (LEI *et al*, 2000; GANDHI *et al*, 2004; TSAI *et al*, 2008). Contudo, o aumento do número de cópias de DNA circulante durante, ou após o tratamento, tem sido associado com a falha de resposta ao tratamento ou recidiva da doença (van ESSER *et al*, 2001; AU *et al*, 2004). Neste contexto, a carga viral de seis pacientes foi completamente monitorada durante e após 6 meses do término do tratamento. No momento do diagnóstico a carga viral desses pacientes variou entre 17 e 3436 cópias/mL com mediana de 1258 cópias/mL. De acordo com estudos prévios, assim como em

nosso estudo, logo após o primeiro ciclo de quimioterapia foi observada uma queda brusca do número de cópias, atingindo níveis indetectáveis no plasma de todos os pacientes. Em 5 dos 6 pacientes, os níveis foram indetectáveis até o final do tratamento. Pacientes com LNH-B que respondem ao tratamento e após seis meses não apresentam recaída da doença são considerados curados (PATTE *et al*, 2002). O paciente 14 (Figura 9) apresentou recidiva após o término do tratamento acompanhada da elevação dos níveis de EBV no plasma. Este paciente não respondeu a terapia de resgate e após 8 meses da recidiva continuou apresentando níveis detectáveis e altos do DNA do EBV no plasma.

Na nossa série de 29 pacientes pediátricos e adultos jovens, havia uma paciente que desenvolveu DLPT após ter sido submetida a um transplante renal. A associação do EBV nesta paciente com DLPT foi confirmada tanto por hibridização *in situ* no tumor como por QPCR no plasma. A severidade da imunossupressão e a infecção pelo vírus EBV constituem fatores risco para o desenvolvimento da DLPT. Em pacientes com baixa imunidade provocada pelo uso de drogas imunossupressoras, a diminuição das células CD4 está envolvida com uma rápida proliferação de células B infectadas pelo EBV, desencadeando o processo patogênico da doença. O diagnóstico precoce da DLPT é importante para definição do esquema de tratamento que inclui redução da imunossupressão, rituximabe ou quimioterapia. Apesar de cada uma dessas formas de tratamento resultar em bons resultados na indução da remissão completa da doença, ainda há relatos de óbitos decorrentes da rejeição ao órgão transplantado pela redução da terapia imunossupressora e infecções relacionadas ao uso de quimioterápicos (GOTTSCHALK *et al*, 2005; HOLMES *et al*, 2002). Uma estratégia terapêutica para

estes pacientes pode ser a utilização de drogas que controlem simultaneamente a DLPT, previnam e tratem a rejeição ao transplante e minimizem a mortalidade provocada pelo tratamento. Recentemente, Gross e colaboradores (2005), utilizaram baixas doses de ciclofosfamida associada com prednisona em uma série de 36 pacientes que apresentaram falha à terapia padrão para o tratamento da DLPT. Utilizando a associação dessas drogas, as sobrevidas: global, livre de recaída e livre de falha ao tratamento em 2 anos foram de 73%, 69% e 67%, respectivamente. O uso doses baixas de ciclofosfamida associada com prednisona resultou em sucesso no tratamento da DLPT de nossa paciente, permitindo redução da toxicidade ao enxerto e infecções relacionadas à quimioterapia. Para a avaliação da resposta ao tratamento desta paciente, além dos parâmetros clínicos disponíveis, utilizamos também o monitoramento da carga viral do EBV no plasma (GROSS et al, 2005; MACHADO *et al*, 2008).

Ensaio quantitativo para detecção do EBV, baseado na técnica de PCR em tempo real têm sido propostos como uma forma não invasiva de diagnóstico e monitoramento da resposta ao tratamento de pacientes imunossuprimidos com DLPT, ou com LNH-AIDS (WEINSTOCK *et al*, 2006; TSAI *et al*, 2008; FAN *et al*, 2005). Há relatos de que em pacientes que sofreram transplante de órgãos, a carga viral do EBV avaliada no sangue aumenta após o diagnóstico de DLPT devido ao *status* de imunossupressão. Entretanto, estudos recentes sugerem que a quantificação intracelular do EBV não é um bom marcador para avaliação diagnóstica e de resposta clínica de pacientes imunossuprimidos quando comparada ao plasma (STEVENS *et al*, 2001; TSAI *et al*, 2008). Um grande estudo realizado por Tsai e colaboradores avaliou o valor da carga viral do EBV

mensurada nas duas amostras biológicas para diagnóstico e avaliação da resposta clínica em 31 pacientes recém transplantados e em 35 casos de DLPT confirmados, respectivamente. Os autores mostraram que a quantificação do EBV no plasma foi um marcador mais específico para avaliação diagnóstica e avaliação de remissão nos pacientes com DLPT quando comparada a concentração do EBV analisada nas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) (TSAI *et al*, 2008). Como observado por aqueles autores, foi possível confirmar em nosso estudo que quantificação do DNA do EBV permitiu avaliar com eficiência a resposta durante a terapia. Ao diagnóstico a carga viral foi de 3436 cópias/mL e tornou-se indetectável após o início do tratamento, permanecendo assim 6 meses depois de seu término.

Em conjunto, os resultados de quantificação do EBV no plasma dos pacientes LNH-B observados no nosso estudo sugerem que o DNA EBV livre no plasma é originado das células tumorais. Nos pacientes com DLPT, além do emprego na resposta ao tratamento, pode ser utilizada como um parâmetro para a seleção do tratamento desses pacientes, especialmente quando a redução da imunossupressão é necessária (MACHADO *et al*, 2008).

No presente estudo também avaliamos a carga viral do EBV no plasma como um marcador de prognóstico em uma coorte constituída por 42 pacientes HIV positivos com diagnóstico de LNH-AIDS. Uma limitação desta análise, foi o fato de que em apenas um paciente o EBV foi confirmado no tumor por hibridização *in situ*. Apesar da limitação imposta pela ausência desta informação, algumas análises foram passíveis de realização. Nos pacientes com LNH-AIDS o

DNA do EBV no plasma pode também ser originado também de CMSP, pois o processo patogênico dos LNH-AIDS é semelhante àquele observado na DLPT e envolve a expansão de células B com infecção latente pelo EBV e /ou, um aumento do número de novas células infectadas pelo vírus em resposta ao *status* de imunossupressão. Um estudo recente avaliou a carga viral do EBV no plasma e nas CMSP, antes e após tratamento com terapia antiretroviral ativa (HAART) em 33 pacientes HIV positivos e sem LNH. Este estudo mostrou que todos os pacientes apresentaram diferentes concentrações do EBV quando avaliadas nas CMSP antes e após o tratamento. No entanto, antes do início do tratamento, em 8 pacientes o EBV foi detectado no plasma, e após o início, o EBV não foi detectado no plasma de nenhum paciente. Um outro estudo monitorou a carga viral no soro e CMSP durante o curso do tratamento de 9 pacientes HIV positivos até o surgimento do LNH. Todos os pacientes apresentaram no soro níveis de EBV indetectáveis, ou em baixas concentrações ao diagnóstico e durante o curso do tratamento. Contudo, em um dos pacientes tratados com HAART foi observado um declínio da carga viral do EBV avaliada nas CMSP e um aumento dos níveis de EBV no soro no momento do surgimento do LNH. Em conjunto estes dois estudos sugerem que no plasma de pacientes infectados pelo HIV, a concentração do EBV pode estar relacionada à presença de LNH-AIDS (RIGHETHI *et al*, 2002; van BARLE *et al*, 2002).

Recentemente, Fan e colaboradores (2006) observaram uma correlação positiva entre os métodos de detecção do EBV por QPCR no plasma e hibridização *in situ* no tumor de pacientes portadores de HIV com diagnóstico de linfomas, incluindo LNH. O resultado da detecção do EBV foi concordante para

ambos os métodos em 69% dos casos de LNH-AIDS. Além disso, mostraram que as concentrações do EBV variavam com mediana de 3210 cópias/mL (FAN *et al*, 2005). Em nosso estudo dos 42 pacientes avaliados, em 25 o EBV foi detectado no plasma, e a carga viral do EBV no momento do diagnóstico do LNH variou entre 17 a 52000 cópias/mL com mediana de 1300 cópias/mL. A discrepância entre os valores da mediana apresentada no nosso trabalho e o de Fan e colaboradores pode ser explicada. A região do genoma viral utilizada no estudo desses autores foi a região *BamH1W*, enquanto que no nosso a região selecionada foi a do *EBNA-1*. Um outro estudo desse mesmo grupo mostrou que a região *BamH1W* apresentava uma alta eficiência de amplificação por constituir um alvo que contém entre 7 e 11 repetições dentro do genoma. Esta região pode, dependendo da cepa viral presente na amostra, superestimar ou subestimar a quantificação do número de cópias do EBV. Neste mesmo estudo os autores apontaram como um dos melhores alvos o *EBNA-1*, o qual é um gene conservado presente em apenas uma cópia no genoma viral (RYAN *et al*, 2004). O estudo de Fan e colaboradores foi um dos primeiros a inferir uma concentração de 2500 cópias de DNA do EBV no plasma de pacientes HIV positivos a ser utilizada como ponto de corte definidor da presença de linfoma. Entretanto, é preciso ressaltar que este valor foi obtido através do valor máximo do número de cópias apresentado no grupo controle constituído de pacientes HIV positivos sem linfoma, porém com histórico de infecções virais (FAN *et al*, 2005).

No INCA não são tratados pacientes HIV positivos sem diagnóstico de neoplasias. Portanto, não foi possível incluir este grupo de indivíduos como controles e esta também foi uma limitação de nosso estudo. Contudo, quando

comparamos as cargas virais obtidas no plasma dos pacientes LNH-AIDS (1300 cópias/mL) e LNH-B (1258 cópias/mL), uma observação interessante foi que não houve diferença estatística entre as medianas do número de cópias, mesmo com a diferença amostral de indivíduos nos grupos. De acordo com estudos prévios apresentados acima, este resultado sugere que pode haver uma relação entre a presença de DNA do EBV no plasma e a presença de LNH-AIDS.

Na era pré HAART os pacientes com LNH-AIDS eram tratados com dose baixa de quimioterapia em virtude da toxicidade observada quando se empregava esquemas de tratamento mais intensivos. Nestes pacientes a pSG em 2 anos era de somente 10% (KAPLAN *et al*, 1997). Com a introdução da HAART foi possível a administração de regimes quimioterápicos com as doses preconizadas, sem ocorrência de toxicidade excessiva. Na era pós HAART, o controle da replicação do HIV através do uso de antiretrovirais tem sido associado com a diminuição da incidência dos linfomas relacionados ao HIV. No entanto, os LNH-AIDS continuam sendo uma das principais causas de mortalidade entre pacientes portadores do HIV (RATNER *et al*, 2001; BESSON *et al*, 2001). Os principais fatores definidores de prognóstico utilizados após a introdução deste esquema de tratamento são a idade, IPI, níveis da enzima LDH e *performance status* no momento do diagnóstico. Neste contexto, os pacientes LNH-AIDS do presente estudo tiveram pSG de 34% em aproximadamente 2 anos. A avaliação do impacto das variáveis clínicas de prognóstico como IPI e estágio na pSG, confirmou que ambos são fatores de prognóstico importantes. Os pacientes que apresentaram IPI com valores de 2 e 3, e estágios avançados (III e IV), considerados de alto risco no momento do diagnóstico do LNH, tiveram uma pSG menor quando comparada

aos pacientes com prognóstico de baixo risco. É importante ressaltar que a baixa taxa de sobrevida global observada nos pacientes desta série pode ser um reflexo do retardo do diagnóstico, e também do *status* de imunossupressão, visto que a grande maioria destes pacientes não estava em uso de HAART, e em alguns, o resultado da contagem de células CD4 e CD8 não era conhecido.

Para avaliar o impacto do EBV no plasma, os pacientes com LNH-AIDS foram avaliados quanto presença e quantidade do EBV no plasma em relação à pSG. No primeiro momento, os 42 pacientes foram avaliados somente quanto à presença do EBV. Dos 42 pacientes, 17 foram negativos e 25 positivos. Os dados obtidos mostraram que não houve diferença estatística entre a pSG entre os pacientes positivos e negativos (Log rank = 0,18). A falta de correlação entre a detecção do EBV e a pSG também tem sido relatada por outros estudos em pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos com diagnóstico de linfomas (SUWIWAT *et al*, 2007; BOSSOLASCO *et al*, 2006; LEUNG *et al*, 2003). No entanto, a observação de que os pacientes LNH-AIDS EBV positivo tiveram uma probabilidade de sobrevida menor quando comparados aos EBV negativos, sugere a hipótese de que a ausência de correlação entre a pSG e a associação do EBV na coorte do presente estudo pode ser revertida com o aumento do número de pacientes e um estudo prospectivo mais controlado.

Não há na literatura referência a um número exato de cópias do EBV que possa ser utilizado como ponto do corte para a avaliação do prognóstico. A grande maioria desses estudos utilizou como base a mediana de cópias obtida entre os indivíduos controles, ou mesmo àquela obtida de pacientes antes do

início da terapia. Um estudo recente mostrou que níveis no plasma acima de 4000 cópias do EBV/mL, foram fortemente associados a um pior prognóstico em pacientes com carcinoma de nasofaringe. Adicionalmente, Au e colaboradores (2004) utilizando o *cut-off* de 6×10^7 cópias/mL no plasma de pacientes imunocompetentes com LNH, também mostraram uma correlação com o prognóstico adverso dos pacientes que tinham níveis elevados do EBV no plasma. A mesma correlação foi obtida em nosso estudo quando avaliamos o impacto da carga viral do EBV na pSG dos pacientes utilizando como ponto de corte 1300 cópias/mL, obtido pela mediana do número de cópias. Surpreendentemente, pacientes com concentração de DNA ≥ 1300 cópias/mL tiveram estimativa de SG de 28% em 2 anos, significativamente menor quando comparados aos pacientes com concentração de DNA < 1300 cópias/mL (52% em 2 anos).

Não obstante todas as dificuldades, o interesse na utilização do DNA circulante no plasma como um biomarcador está crescendo rapidamente, uma vez que é um método não invasivo e que pode gerar um rápido resultado, com aplicabilidade em várias doenças e, principalmente, na detecção e no monitoramento do câncer. Neste contexto, apesar das limitações observadas neste estudo, o conjunto dos resultados sugere que o DNA circulante pode ser um parâmetro não invasivo, sensível e rápido para avaliação do prognóstico, monitoramento da resposta ao tratamento e possivelmente, diagnóstico em pacientes com LNH.

6 CONCLUSÕES

- O DNA circulante avaliado de forma quantitativa pode ser um marcador biológico nos linfomas não Hodgkin-B.
- A detecção do EBV no plasma por QPCR aferida no momento do diagnóstico correlacionou-se fortemente com a presença do vírus no tumor por hibridização *in situ* sugerindo uma possível aplicação no diagnóstico dos linfomas associados ao EBV.
- A redução do DNA total circulante e da carga viral após o início do tratamento quimioterápico indica uma associação entre a carga tumoral e a concentração do DNA no plasma, mais especificamente com a carga viral do EBV.
- A correlação dos níveis de DNA circulante com o perfil de resposta ao tratamento (remissão ou recidiva) indica o valor desta abordagem na avaliação durante o tratamento.
- Apesar do número reduzido de pacientes com LNH-AIDS, foi possível mostrar que concentrações elevadas de DNA do EBV > 1300 cópias/mL plasma foram relacionadas com um pior prognóstico tendo impacto na SG dos pacientes com LNH-AIDS associados ao EBV.
- A metodologia desenvolvida para quantificação do EBV no plasma poderá ser uma ferramenta de avaliação a ser aplicada em pacientes com linfomas associados ao EBV em diferentes cenários no curso da doença.

REFERÊNCIAS

ALLAN, J. M. *et al.* Genetic alterations in bronchial mucosa and plasma DNA from individuals at high risk of lung cancer. *Int J Cancer*. v. 91, n. 3, p. 359-65, 2001.

ANKER, P. *et al.* K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*. v. 112, n. 4, p. 1114-1120, 1997.

ARAUJO, I. *et al.* Expression of Epstein-Barr virus-gene products in Burkitt's lymphoma in Northeast Brazil. *Blood*. v. 87, n. 12, p. 5279-5286, 1996.

AU, W.Y. *et al.* Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients. *Blood*. v.104, n. 1 p. 243-249, 2004.

BAIOCCHI, O.C. *et al.* Quantification of Epstein-Barr viral load and determination of a cut-off value to predict the risk of post-transplant lymphoproliferative disease in a renal transplant cohort. *Haematologica*. v. 89, n. 3, p. 366-366. 2004

BALANÍA C. *et al.* O6-methyl-guanine-DNA methyltransferase methylation in serum and tumor DNA predicts response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea but not to temozolamide plus cisplatin in glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. v. 9, n. 4, p. 1461-1468. 2003

BASTIAN, P.J. *et al.* Prognostic value of preoperative serum cell-free circulating DNA in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*. v.13, n.18, Pt .1, p. 5361-5367. 2007

BAZAN, V. *et al.* Molecular detection of TP53, Ki-Ras and p16INK4A promoter methylation in plasma of patients with colorectal cancer and its association with prognosis. Results of a 3-year GOIM (Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale) prospective study. *Ann Oncol*. v.17, Suppl. 7, p.84-90, 2006.

BEAU-FALLER, M. *et al.* Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. *Int J Cancer*. v.105, n. 3, p. 361-370. 2003.

BESSON, C. *et al.* Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly antiretroviral therapy. *Blood*. v. 98, n.8, p. 2339-2344. 2001.

BISCHOFF, F.Z.; LEWIS, D.E.; SIMPSON, J,L. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update*. v.11, n. 1, p. 59-67. 2005.

BLUM, K.A.; LOZANSKI, G.; BYRD, J.C. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. v.104, n. 10, p. 3009-3020. 2004.

BONNET, F. *et al.* A longitudinal and prospective study of Epstein-Barr virus load in AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *Journal of Clinical Virology*. v. 36, n. 4, p. 258-263. 2006.

BOSSOLASCO, S. *et al.* Epstein-Barr virus DNA load in cerebrospinal fluid and plasma of patients with AIDS-related lymphoma. *J Neurovirol*. v. 8, n. 5, p. 432-438. 2002.

BOSSOLASCO, S. *et al.* Ganciclovir is associated with low or undetectable Epstein-Barr virus DNA load in cerebrospinal fluid of patients with HIV-related primary central nervous system lymphoma. *Clin Infect Dis*. v. 15, n.42(4), p. 21-25. 2006.

BRADY, G.; MACARTHUR, G.J; FARRELL, P.J. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol*. v. 60, n. 12, p.1397-1402. 2007.

BUTT, A.N.; SWAMINATHAN, R. Overview of circulating nucleic acids in plasma/serum. *Ann N Y Acad Sci*. v. 1137, p. 236-242. 2008

CHAN, K.C. *et al.* Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Res*. v. 63, n. 9, p. 2028-2032. 2003

CHEN, Z. *et al.* Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses*. v.65, n. 5, p. 956-961. 2005.

CHIU, R.W.; LO, Y,M. Application of fetal DNA in maternal plasma for noninvasive prenatal diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. v. 2, n. 1, p. 32-40. 2002.

CHUN, F.K. *et al.* Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int*. v. 98, n. 3, p. 544-548. 2006.

COIFFIER, B. *et al.* Prognostic factors in aggressive malignant lymphomas: description and validation of a prognostic index that could identify patients requiring a more intensive therapy. *J Clin Oncol*. v. 9, p. 211-219.1991.

COMBARET, V. *et al.* Circulating MYCN DNA as a tumor-specific marker in neuroblastoma patients. *Cancer Res*. v. 62, n. 13, p. 3646-3648. 2002.

DELIGEZER, U. *et al.* Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients. *Clin Chim Acta*. v. 335, n. 1-2, p. 89-94. 2003.

DOMINGUEZ-SOLA, D. et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*. v. 26; n. 448(7152), p. 445-451. 2007.

EPSTEIN, M.A.; ACHONG, B.G.; BARR, Y.M. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet*. v. 1, n. 7335, p. 702-703. 1964.

FAN, H. et al. Epstein-Barr viral load as a marker of lymphoma in AIDS patients. *J Med Virol*. v. 75, n. 1, p. 59-69. 2005

FERRY, J.A. Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. *The Oncologist*, v. 11, p. 375-383, 2006.

FISHER, B. et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*. v. 52, n. 9, p. 1551-1557. 1983.

FLEISCHHACKER, M.; SCHMIDT, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer -a survey. *Biochim Biophys Acta*. v. 1775, n. 1, p. 181-232. 2007.

FOX A, GAL S, FISHER N, SMYTHE J, WAINSCOAT J, TYLER MP, WATT SM, HARRIS AL. Quantification of circulating cell-free plasma DNA and endothelial gene RNA in patients with burns and relation to acute thermal injury. *Burns*. 2008;34(6):809-16.

FRICKHOFEN, N. et al. Rearranged Ig heavy chain DNA is detectable in cell-free blood samples of patients with B-cell neoplasia. *Blood*. v. 90, n. 12, p. 4953-4960. 1997.

GAHAN, P.B.; SWAMINATHAN, R. Circulating nucleic acids in plasma and serum. Recent developments. *Ann N Y Acad Sci*. v. 1137, p. 1-6. 2008.

GAIDANO, G.; CARBONE, A. AIDS-related lymphomas: from pathogenesis to pathology. *Br J Haematol*. v. 90, p. 235-243. 1995.

GANDHI, M.K. et al. Plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA is a biomarker for EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. v. 12, n. 2, p. 460-464. 2006.

GAUTSCHI, O. et al. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J. Clin Oncol*. v. 15, n.22(20), p.4157-64. 2004

GAUTSCHI, O. et al. Origin and prognostic value of circulating KRAS mutations in lung cancer patients. *Cancer Lett.* v. 254, n. 2, p. 265-273. 2007.

GEMMA, L. K; ALAN B. R. Burkitt Lymphoma: Revising the Pathogenesis of a Virus-Associated Malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* p. 277-84. 2007.

GLICKMAN, J.N; HOWE, J.G; STEIZ, J.A. Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol*, v. 62, p. 902–11.1988.

GOESSL, C. et al. DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol.* v. 41, n. 6, p. 668-676. 2002.

GONZALEZ, R. et al. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann Oncol.* v. 11, n. 9, p. 1097-104. 2000.

GORMALLY, E. et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance. *Mutation Research.* v. 635, p. 105-117, 2007.

GOTTSCHALK, S.; ROONEY, C.M.; HESLOP, H.E . Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med.* v. 56, p. 29–44. 2005.

GROSS, T.G. et al. Low-dose chemotherapy for Epstein-Barr virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease in children after solid organ transplantation. *J Clin Oncol.*v. 23, p. 6481–6488. 2005.

HARRIS, N.L. et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol.* v. 10, n. 12, p. 1419-1432. 1999.

HASSAN, R. et al .Clinical and demographic characteristics of Epstein-Barr virus-associated childhood Burkitt's lymphoma in Southeastern Brazil: epidemiological insights from an intermediate risk region. *Haematologica.* v. 93, n. 5, p. 780-783. 2008.

HASSAN, R. et al.Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol.* v. 1, n.17, p. 1- 7. 2006.

HAYDEN, R.T. et al.Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol.* v. 46, n. 1, p, 157-163. 2008

HEID, C.A. et al. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. v. 6, p. 986-994, 1996.

HIRST, M.; MARRA, M.A. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. v. 41, n. 1, p. 136-146. 2009.

HJALGRIM, H.; ENGELS, .EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med*. v. 264, n. 6, p. 537-548. 2008.

HOFFMANN, C.; WOLF, E.; FAETKENHEUER, G. Response to highly active antiretroviral therapy strongly predicts outcome in patients with AIDS-related lymphoma. *AIDS* . v. 17, p. 1521-1529. 2003.

HOHAUS, S. et al . Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*. v. 20, n. 8, p. 1408-1413. 2009 .

HOLMES, R.D, SOKOL, R.J. Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* . v. 6, p. 456–644. 2002.

HOSNY, G.; FARAHAT, N.; HAINAUT, P. TP53 mutations in circulating free DNA from Egyptian patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Lett*. v. 275, n. 2, p. 234-239. 2009.

HUANG, Z.H.; LI, L.H.; HUA ,D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett*. v. 243, n. 1, p. 64-70. 2006.

JAHN ,S. et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. v. 61, n. 4, p. 1659-1665. 2001.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. v. 55, n. 4, p. 259. 2005.

JORGEZ ,C.J. et al. Elevated levels of total (maternal and fetal) beta-globin DNA in maternal blood from first trimester pregnancies with trisomy 21. *Hum Reprod.*; v. 22, n. 8, p. 2267-2272. 2007.

KAMAT, A.A. et al. Quantification of total plasma cell-free DNA in ovarian cancer using real-time PCR. *Ann N Y Acad Sci*. p. 1075:230-4. 2006

KAPLAN, L.D; STRAUS, D.J; TESTA, M.A. Low-dose compared with standard m-BACOD chemotherapy for non-Hodgkin' s lymphoma associated with immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. v. 336, p. 1641-1648. 1997.

KIRK, O. et al. Non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood*. v. 98, n. 12, p. 3406-3412. 2001.

KLUMB, C.E. Biology and Pathogenesis of B Non-Hodgkin Lymphoma in childhood: a Review. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 47, n. 3, p. 291-301, 2001.

KLUMB, C.E. et al. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas: prognostic implications. *Eur J Haematol*, v. 71, n. 2, p. 81-90. 2003.

KLUMB, C.E. et al . Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer*, v. 108, n. 1, p, 66-70. 2004. (a)

KLUMB, C.E. et al. Treatment of children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in developing countries: the experience of a single center in Brazil. *J Pediatr Hematol Oncol*. v. 26, n. 7, p. 462-468. 2004. (b)

KORNACKER, M. et al. Detection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell specific immunoglobulin gene rearrangement in the serum DNA of a patient with Hodgkin's disease. *Br J Haematol*. v. 106, n. 2, p, 528-531. 1999.

KRISTINSSON, S.Y. et al. Genetics- and immune-related factors in the pathogenesis of lymphoplasmacytic lymphoma/ Waldenström's macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma*. v. 9, n. 1, p. 23-26. 2009.

KUTOK, J.L; WANG, F. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*. v. 1, p. 375-404. 2006.

LAM, N.Y. et al. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin Chem*. v.49, n.8, p.1286-91.2003

LAMBERT, N.C. et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood*. v. 100, n. 8, p. 2845-2851. 2002.

LAPAIRE, O. et al. Array-CGH analysis of cell-free fetal DNA in 10 mL of amniotic fluid supernatant. *Prenat Diagn*. v. 27, n. 7, p. 616-621. 2007.

LEI ,K.I. et al . Diagnostic and prognostic implications of circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA in natural killer/T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. v. 8, n.1, p. 29-34. 2002.

LEI ,K.I. et al. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol*. v.111, n. 1, p. 239-246. 2000.

LEON, S.A. et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. v.37, n. 3, p. 646-650. 1977.

LEONCINNI, M. *et al.* Burkitt Lymphoma. In:; Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue (IARC WHO Classification of Tumours)*. Lyon (France) IARC Press. p. 262-268. 2007.

LEUNG, S.F. *et al.* Pretherapy quantitative measurement of circulating Epstein-Barr virus DNA is predictive of posttherapy distant failure in patients with early-stage nasopharyngeal carcinoma of undifferentiated type. *Cancer*. v. 15, n.98, f. 2, p. 288-291. 2003.

LIN, J.C. *et al.* Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med*. v. 350, n. 24, p. 2461-2470. 2004.

LO, Y.M. *et al.* Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. v. 1, n.59, f. 21, p. 5452-5455. 1999. (b)

LO, Y.M.; CHIU, R.W. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. *Clin Chem*. v. 54, n. 3, p.461-466. 2008.

LO, Y.M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. v. 350(9076), p. 485-487. 1997.

LO, Y.M. *et al.* Plasma cell-free Epstein-Barr virus DNA quantitation in patients with nasopharyngeal carcinoma. Correlation with clinical staging. *Ann N Y Acad Sci*. v. 906, p. 99-101. 2000. (a)

LO, Y.M. *et al.* Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. *Clin Chem*. v. 45, n. 2, p.184-188. 1999. (a)

LO, Y.M. *et al.* Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem*. v.46, n.3, p. 319-323. 2000. (b)

LO, Y.M. *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *American Journal of Human Genetics*. v. 62, p.768-775, 1998.

LUI, Y.Y. *et al.* Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. v.48, n. 3, p. 421- 427. 2002.

LUI, Y.Y. *et al.* Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem*. v. 49, n. 3, p. 495-496. 2003.

MACHADO, A.S. *et al.* Plasma Epstein-Barr viral load predicting response after chemotherapy for post-transplant lymphoproliferative disease. *Clin Exp Med.* v.8, n. 2, p. 129-132. 2008.

MAMZER-BRUNEEL, M.F. *et al.* Durable remission after aggressive chemotherapy for very late post-kidney transplant lymphoproliferation: A report of 16 cases observed in a single center. *J Clin Oncol.* v. 18, n.21, p. 3622-3632. 2000.

MANDEL, P; METAIS, P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C.R. Acad. Sci. Paris.* v. 142, p. 241-243. 1948.

MEHRA, N. *et al.* Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res.* v. 13(2 Pt 1), p.421-426. 2007.

MISAWA, A. *et al.* RASSF1A hypermethylation in pretreatment serum DNA of neuroblastoma patients: a prognostic marker. *Br J Cancer.* v. 100, n. (2), p. 399-404. 2009.

MORI, T. *et al.* Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol.* v. 23, n. 36, p. 9351-9358. 2005.

MULCAHY, H.E. *et al.* A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res.* v. 4, n. 2, p. 271-275. 1998.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res.* v. 256, n. 1, p. 12-18. 2000.

NAKAYAMA, H. *et al.* Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of recurrent colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* v. 105, n. 4, p. 491-493. 2003.

PACI, M. *et al.* Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* v.64, n.1, p. 92-97. 2009.

PATHAK, A.K. *et al.* Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem.* v. 52, n. 10, p. 1833-1842. 2006.

PATTE, C. *et al.* FAB/LMB96 International Study Committee. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood.* v. 109, n. 7, p. 2773-2780. 2007.

PATTE C. Treatment of mature B-ALL and high grade B-NHL in children. *Best Pract Res Clin Haematol.* v. 15, n. 4, p. 695-711. 2002.

QUEIROGA, E.M. *et al.* Viral studies in burkitt lymphoma: association with Epstein-Barr virus but not HHV-8. *Am J Clin Pathol.* v. 130, n. 2, p.186-192. 2008. (B)

QUEIROGA, E.M. *et al.* Burkitt lymphoma in Brazil is characterized by geographically distinct clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol.* v. 130, n. 6, p. 946-956. 2008. (A)

RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol.* v. 12, n. 6, p. 431-441. 2002.

RAINER, T.H. *et al.* Comparison of plasma beta-globin DNA and S-100 protein concentrations in acute stroke. *Clin Chim Acta.* v. 376(1-2), p. 190-196. 2007.

RAINER, T.H. *et al.* Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem.* v. 49, n. 4, p. 562-569. 2003.

RAPHAEL, M; BORISCH, B; JAFFE, E.S. Lymphomas associated with infection by the human immune deficiency virus (HIV) In: Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (WHO classification of tumours).* Lyon (France) IARC Press, p. 260-263. 2001.

RATNER, L. *et al.* Chemotherapy for human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in combination with highly active antiretroviral therapy. *J Clin Oncol.* v. 27, p. 21-78. 2001.

REITER, A. *et al.* Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood.* v. 94, n. 10, p. 3294-3306. 1999.

REZK, S.A; WEISS, L.M. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum Pathol.* v. 38, n. 9, p. 1293-1304. 2007.

RHODES, A. *et al.* Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care.* v. 10, n. 2, p. 60. 2006.

RIGHETTI, E. *et al.* Dynamics of Epstein-Barr virus in HIV-1-infected subjects on highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* v. 16(1), p. 63-73. 2002.

ROSENBERG, S.A. Report of the committee on the staging of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* v. 26, p. 1310. 1966.

RYAN, J.L. *et al.* Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J Mol Diagn.* v. 6, p. 378-385. 2004.

SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRISCH, E.F. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Lab. Press. Cold Spring Harbour, New York, 1989

SANDLUND, J.T. Should adolescents with NHL be treated as old children or young adults? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. p, 297-303. 2007

SANDLUNG, J.T. *et al* . Predominance and characteristics of Burkitt lymphoma among children with non-Hodgkin lymphoma in northeastern Brazil. *Leukemia*. v.11, p. 743-746. 1997.

SCHWARZ, A. K. *et al*.Quantification of free total plasma DNA and minimal residual disease detection in the plasma of children with acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol*. v. 88, n. 9, p. 897-905. 2009.

SCHWARZENBACH , H. *et al*. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. v. 15, n. 3, p. 1032-1038. 2009.

SHAO, J.Y. *et al*. Comparison of Epstein-Barr virus DNA level in plasma, peripheral blood cell and tumor tissue in nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res*. v. 24, n. 6, p. 4059-4066. 2004.

SHIRAMIZU, B. *et al*.Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association.*Blood*. v. 77, n. 7, p. 1516-1526. 1991.

SILVA, J.M. *et al*. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin Cancer Res*. v. 8, n. 12, p. 3761-3766. 2002.

SKVORTSOVA, T.E. *et al*. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer*. v. 94, n. 10, p. 1492-1495. 2006.

SORENSEN, G.D. *et al* . Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v.3, n. 1, p. 67-71. 1994.

SOUSSAIN, C. *et al*. Small noncleaved cell lymphoma and leukemia in adults. A retrospective study of 65 adults treated with the LMB pediatric protocols. *Blood*. v. 85, n. 3, p. 664-674. 1995.

SOZZI, G.*et al*. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. v.21, n. 21, p. 3902-3908, 2003.

SOZZI, G.*et al.* Plasma DNA quantification in lung cancer computed tomography screening: five-year results of a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med.* v.179, n.1, p. 69-74, 2009.

SPANO, J. *et al.* AIDS-related malignancies: state of the art and therapeutic challenges.*J Clin Oncol.* v.10 n. 26, p. 4834-4842, 2008.

STAMEY, T.*et al.* The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol.* v. 172, n.4, p.1297-1301,2004.

STEVENS, S.*et al.* Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of post transplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood.* V. 97, p. 1165-1171.2001.

STROUN, M,*et al.* About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *CLIN CHIM ACTA.* v.313, n. 1-2, p. 139-42, 2001.

SUWIWAT ,S, *et al.* Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in the plasma of patients with peripheral T-cell and NK-cell lymphomas and peripheral T-cell proliferative diseases.*J Clin Virol.* v.40, n. 4, p.277-283. 2007.

SUZUKI, N, *et al.* Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* V. 387, n 1-2, p.55-58, 2008.

SWARUP V, RAJESWARI M. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* v.581, n. 5, p. 795-799, 2007.

SWEETENHAM, J, *et al.* Highly aggressive lymphomas in adults. *Hematol Oncol Clin North Am.* v. 22, n. 5, p. 965-978, 2008.

TAMKOVICH, S. *et al.* Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clin Chem.* v.51, n. 7, p. 1317-1319, 2005.

THORLEY,L, ALLDAY, M. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol.* v. 7, n. 2. p. 172, 2009.

THOMPSON MP, KURZROCK R.Epstein-Barr virus and cancer.*Clin Cancer Res.* v. 1. p.10(3):803-21.2004

TONG, Y.K; LO, Y.M. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids.*Clin Chim Acta.* v.363(1-2), p.187-196.2006

TRAN, H. *et al.* Immunodeficiency-associated lymphomas.*Blood Rev.* v.22, n. 5, p. 261-81, 2008.

TSAL, D.*et al.* EBV PCR in the diagnosis and monitoring of posttransplant lymphoproliferative disorder: results of a two-arm prospective trial. *Am J Transplant*.v.8, n. 5, p. 1016-1024,2008

UMETANI, N ,*et al.* Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol.* v.24, n. 26, p. 4270-4276, 2006.

VAN BAARLE, D. *et al.* Absolute level of Epstein-Barr virus DNA in human immunodeficiency virus type 1 infection is not predictive of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma.*J Infect Dis*.v.186(3), p. :405-9.2002

VAN, ESSER.*et al.* Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*.v.113, n. 3, p.814 – 821, 2001.

VASAVDA ,N, *et al.* Circulating DNA: a potential marker of sickle cell crisis. *Br J Haematol.* v.139, n.2,p.331-336,2007.

WANG, J, *et al.* Molecular detection of APC, K- ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg.* v. 28, n.7, p.721-726,2004

WEINSTOCK, D. *et al.* Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development.*Bone Marrow Transplant.* v.37, n.6, p.539-546, 2006

WEISS, L.*et al.* Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol.* v.139. p.1259–1265, 1991

WONG, T. *et al.* The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR.*Eur J Cancer.* v.39, n.13, p. 1881-1887, 2003

YANG, H, *et al.* Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*.v.14, n. 5, p.903-910, 2004.

YOON, K. *et al.* Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *J Mol Diagn*.v.11, n.3,p.182-185, 2009

ZIEGLER, A, *et al.* Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev*, v. 28, n.5, p. 255-271. 2002

ANEXO 1



COORDENAÇÃO DE PESQUISA
Serviço de Pesquisa Clínica-CPQ
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Rio de Janeiro, 04 de janeiro de 2005.

Dra. Claudete Esteves Nogueira Pinto Klumb
Pesquisadora Principal

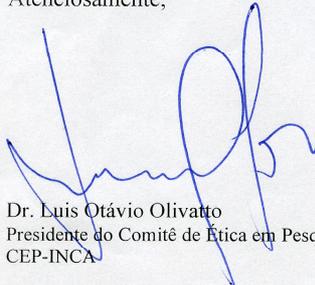
Ref.: Prot. **122/04** – Quantificação do DNA do vírus Epstein Barr (EBV) no diagnóstico e no monitoramento da resposta ao tratamento dos linfomas não Hodgkin-B.

Prezada Doutora,

Vimos por meio desta informar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer decidiu **aprovar**, o Protocolo intitulado: Quantificação do DNA do vírus Epstein Barr (EBV) no diagnóstico e no monitoramento da resposta ao tratamento dos linfomas não Hodgkin-B. em sua reunião de 20/12/04.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,



Dr. Luis Otávio Olivatto
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO 2



Memo 192/06-CEP-INCA

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2006

A(o): Dra. Claudete Esteves Klumb
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 098/06: (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: "Estudo Prospectivo da carga viral do vírus Epstein Barr (EBV) como marcador preditivo de resposta ao tratamento nos linfomas associados ao HIV"

Prezada Doutora

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise, decidiu **aprovar** o Protocolo intitulado: Estudo Prospectivo da carga viral do vírus Epstein Barr (EBV) como marcador preditivo de resposta ao tratamento nos linfomas associados ao HIV A, em 11 de dezembro de 2006.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO 3

Plasma Epstein-Barr viral load predicting response after chemotherapy for post-transplant lymphoproliferative disease

Alex Sandro C. Machado · Alexandre Gustavo Apa ·
Lidia Maria Magalhães de Rezende · Nívea Dias Amoêdo ·
Franklin David Rumjanek · Carlos E. Bacchi · Claudete Esteves Klumb

Received: 24 October 2007 / Accepted: 24 January 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Transplant patients are particularly at risk of developing B post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) related to intensive immunosuppressive treatment to prevent graft rejection. In EBV-positive PTLTs, EBV-DNA can be found in the patients' peripheral blood. Several methods have been described to assess peripheral blood EBV viral load. We report a case of a 13-year-old child who developed EBV-positive PTLT after renal transplantation. We assessed EBV plasma viral load by quantitative PCR and we found that the clearance of EBV-DNA correlated well with response to treatment.

Keywords PTLT · Epstein-Barr virus · Plasma viral load · Treatment

Introduction

Transplant patients are particularly at risk of developing B post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) related to intensive immunosuppressive regimens to prevent graft rejection [1]. PTLTs are a heterogeneous group of disorders with a wide spectrum varying from lymphoid hyperplasia to clonal malignancy. Their occurrence is linked to Epstein-Barr virus infection (EBV) [2]. The frequency of PTLT is higher in children than in adults, which may be due to more frequent EBV-seronegative status of children compared to adult recipients at the time of the transplant and the high prevalence of EBV seropositivity among donors [3]. Reduction of immune suppression via decrease or interruption of immunosuppressive therapy remains the first approach. However, response rates range from 20% to 86%. Most patients need a combination of immunosuppression reduction with antiviral therapy, chemotherapy and/or chemoimmunotherapy. Some are treated with chemotherapy or immunotherapy alone [4, 5]. Especially if intensive chemotherapy is given, treatment-related morbidity is high. Recent studies have shown that EBV viral load is effectively cleared in plasma during remission of PTLT, previewing the response to therapy and providing a powerful tool to adjust and select the treatment in individuals with EBV-positive PTLT [6]. Here, we describe the case of a 13-year-old child who developed EBV-positive PTLT after renal transplantation in which EBV plasma viral load was monitored during tailored chemotherapy.

Case report

A 13-year-old girl was admitted to the Hematology Service, Cancer Hospital-I with a history of tetralogy of

A.S.C. Machado · A.G. Apa · C.E. Klumb (✉)
Serviço de Hematologia,
Laboratório de Hematologia Celular e Molecular,
Hospital do Câncer I,
Instituto Nacional do Câncer (INCA),
Praça Cruz Vermelha, 23/6th floor,
20 230-130 Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: cklumb@inca.gov.br

L.M. Magalhães de Rezende
Divisão de Patologia,
Instituto Nacional do Câncer (INCA),
Rio de Janeiro, Brazil

N.D. Amoêdo · F.D. Rumjanek
Departamento de Bioquímica Médica,
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brazil

C.E. Bacchi
Consultoria em Patologia,
Botucatu, SP, Brazil

Fallot associated with congenital uterine and vaginal atresia and a single kidney. At 12 years of age she had been submitted to kidney transplantation due to long-standing end-stage renal disease, with the organ being donated by her mother. She was then placed on mycophenolate mofetil (MMF), 350 mg/m² bid, tacrolimus (FK506) 0.2 mg/kg/day and prednisone 0.4 mg/kg/day. Fourteen months after transplantation, she presented with odynophagia, enlargement of tonsils and right cervical lymphadenopathy. Computed tomography (CT) scan of head and neck showed right cavum infiltrative lesion associated to a right cervical adenomegaly. An incisional biopsy of the cervical mass displayed histological features typical of PTLD classified as monomorphic diffuse large cell lymphoma by WHO's classification [7]. Immunohistochemistry revealed the following phenotypes CD20+, CD30-, CD10-, CD3-, TdT- and BCL6-. The association with EBV was confirmed by *in situ* hybridisation for Epstein-Barr-encoded RNAs (EBERs) and latent membrane protein immunohistochemistry (LMP1) as previously described [8, 9]. According to St. Jude's criteria, the patient had stage II [10]. The patient's EBV status before the kidney transplantation was unknown. EBV plasma viral load was determined by a real-time quantitative assay. At diagnosis the viral load was 3436 copies/ml (Fig. 1). The doses of immunosuppressive medications were reduced as the first step. The patient was treated with 2 cycles of modified B-non-Hodgkin's lymphoma-Berlin-Frankfurt-Münster-90 protocol, then received 6 cycles of a low-dose chemotherapy regimen [11, 12]. The chemotherapy regimen was switched because of febrile neutropenia, severe mucositis and deterioration of renal function occurring after the second intensive chemotherapy cycle. Complete remission (CR) of PTLD was reached after 2 cycles of the modified

BFM-protocol, as confirmed by CT scan. EBV plasma viral load was serially monitored during treatment and fell to an undetectable level after the first BFM cycle, remaining undetectable through 4 time points (Fig. 1). Twenty-eight months after remission there is no evidence of PTLD recurrence or renal function deterioration.

EBV viral load method

A real-time quantitative system (Q-PCR) was developed for EBV-DNA detection toward the *EBNA1* region. The assay was based on amplification of a highly conserved region of *EBNA1*, a single copy of EBV that is essential for maintaining the virus long-term in dividing cells. In previous studies, this region of the viral genome was proved to allow reliable EBV-DNA amplification in samples from patients with various EBV-associated diseases worldwide [13]. Sequence data for the EBV genome were obtained from the GenBank Sequence Database (accession number V01555). PCR primers and TaqMan probes targeting the *EBNA1* gene were designed by Applied BioSystems. A standard curve was run in triplicate using DNA extracted from an EBV-positive cell line, Raji (50 copies of EBV per cell).

Discussion

The term PTLD is used to describe a heterogeneous group of disorders ranging from polyclonal lymphocyte proliferation to monoclonal B- and occasionally T-cell malignancies [1]. After solid organ transplantation, PTLD occurs more frequently in children than in adults [3]. EBV infection is of particular concern in paediatric

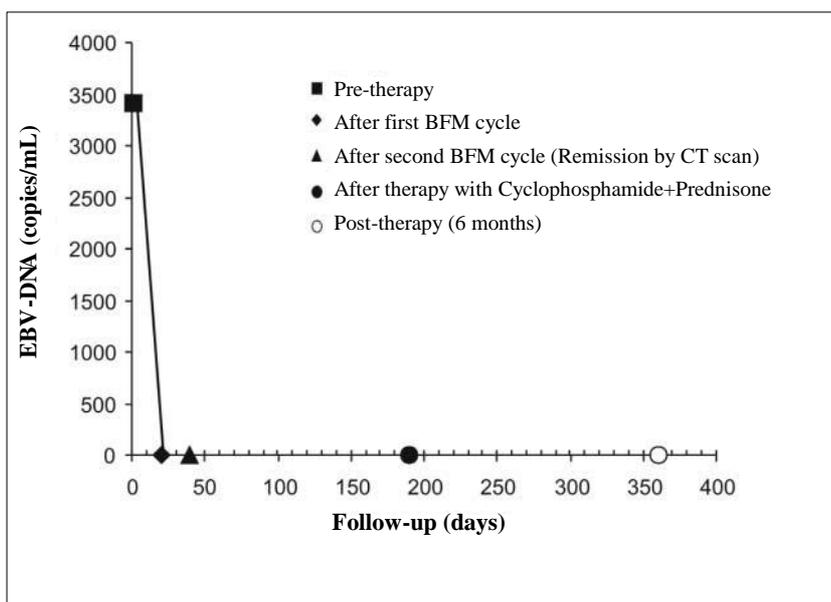


Fig. 1 EBV plasma viral load at diagnosis, time of remission and post-therapy (x-axis). The y-axis denotes the amount of EBV-DNA expressed as copies of EBV-DNA per millilitre of plasma

transplant recipients, as primary infection of seronegative patients is more likely to lead to PTLD. Other risk factors include age after transplant, severity of immunosuppression and concurrent CMV infection [14]. FK506 and MMF have been reported to increase PTLD risk [15]. Conversely, a recent report from the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS) concluded that FK506 and MMF use are not currently associated with the risk of increasing PTLD in paediatric kidney transplants [16]. It is noteworthy that other risk factors, such as recipient EBV serostatus at transplant, may also impact on the development of PTLD. Patients who are EBV-negative at time of transplantation are at highest risk for PTLD if they receive an organ from an EBV-positive donor. Because donor and recipient EBV testing were not carried out in our patient and her organ donor before transplantation, it was not possible to evaluate the impact of EBV-status mismatching on the risk of PTLD.

Reduction of immune suppression remains the standard therapy for PTLD after solid organ transplantation with a success rate varying from 20% to 86% [5, 17]. On the other hand, chemotherapy-based regimens are effective in inducing CR, with relapse and allograft loss being rare (< 5%). However, chemotherapy-related morbidity as a result of graft toxicity and infections may become an additional problem for these patients. At present, several strategies for PTLD treatment are being implemented in the clinical settings. The introduction of rituximab has markedly changed the approach to therapy of patients with PTLD, but response to treatment varies substantially between patients and there are few reports of paediatric prospective studies [18–20].

An alternative approach may be the use of drugs that simultaneously control the lymphoproliferative outgrowth, prevent or treat allograft rejection and minimise treatment-related mortality. Recently Gross et al. [12] reported the results of treatment with a low dose of cyclophosphamide associated with prednisone in a series of 36 children who experienced failure with front-line therapy for PTLD. Using this regimen, the 2-year overall, relapse-free and failure-free survival were 73%, 69% and 67%, respectively [12]. This report represented the largest cohort of children treated in a prospective fashion with a uniform chemotherapy regimen. The use of a low dose of cyclophosphamide associated with prednisone was effective in treatment of EBV-PTLD in our patient and allowed reduction of graft toxicity and infections related to chemotherapy.

PTLD is associated to a rapid rise of viral loads in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [21–24]. However, the relationship between EBV-DNA load in PBMCs and clinical response is missing because EBV-infected cells in peripheral blood are not found in the same compartment as tumour cells. Therefore, monitor-

ing viral load in peripheral blood does not predict clinical response of patients with PTLD [24]. A recent study has shown that EBV viral load is more effectively cleared in plasma compared to PBMCs during remission of PTLD [6]. In the present case we were able to confirm that quantification of viral load in plasma allows accurate prediction of the response during therapy. At diagnosis the viral load was 3436 copies/ml and was undetectable at four time points after the onset of the treatment, including 6 months from its end. This method may provide an informative tool to adjust and select treatment in patients with EBV-PTLD, especially when tailored chemotherapy is needed. In order to better define the role of EBV plasma viral load in the subset of PTLD, large prospective studies should be planned. Data emerging from these studies could help clinicians to optimally stratify and determine the treatment according to risk of allograft rejection, and treatment-related mortality.

Acknowledgements This work was supported by grants from SwissBridge Foundation, Switzerland and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo No. 400801/2005-1.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest related to the publication of this manuscript.

References

- Gotschalk S, Rooney CM, Heslop HE (2005) Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* 56:29–44
- Snow AL, Martinez OM (2007) Epstein-Barr virus: evasive maneuvers in the development of PTLD. *Am J Transplant* 7:271–277
- Holmes RD, Sokol RJ (2002) Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant* 6:456–644
- Hayashi RJ, Kraus MD, Patel AL et al (2001) Posttransplant lymphoproliferative disease in children: correlation of histology to clinical behavior. *J Pediatr Hematol Oncol* 23:14–18
- Praghakaran K, Wise B, Chen A et al (1999) Rational management of posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric recipients. *J Pediatr Surg* 34:112–115
- van Esser JW, Niesters HG, Thijssen SF et al (2001) Molecular quantification of viral load in plasma allows for fast and accurate prediction of response to therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 113:814–821
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al (1999) The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol* 10:1419–1432
- Klumb CE, Hassan R, De Oliveira DE et al (2004) Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer* 108:66–70
- Elgui de Oliveira D, Bacchi MM, Abreu ES et al (2002) Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection. *Am J Clin Pathol* 118:25–30

10. Murphy SB, Fairclough DL, Hutchison RE, Berard CW (1989) Non-Hodgkin's lymphomas of childhood: an analysis of the histology, staging, and response to treatment of 338 cases at a single institution. *J Clin Oncol* 7:186–193
11. Klumb CE, Schramm MT, De Rezende LM et al (2004) Treatment of children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma in developing countries: the experience of a single center in Brazil. *J Pediatr Hematol Oncol* 26:462–468
12. Gross TG, Bucuvalas JC, Park JR et al (2005) Low-dose chemotherapy for Epstein-Barr virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease in children after solid organ transplantation. *J Clin Oncol* 23:6481–6488
13. Ryan JL, Fan H, Glaser SL et al (2004) Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J Mol Diagn* 6:378–385
14. Razonable RR, Paya CV (2003) Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes* 10:60–65
15. Sarmiento JM, Dockrell DH, Schwab TR et al (2000) Mycophenolate mofetil increases cytomegalovirus invasive organ disease in renal transplant patients. *Clin Transplant* 14:136–138
16. Dharnidharka VR, Ho PL, Stablein DM et al (2002) Mycophenolate, tacrolimus and post-transplant lymphoproliferative disorder: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Transplant* 6:396–399
17. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA et al (1999) Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting *Transplantation* 68:1517–1525
18. Svoboda J, Kotloff R, Tsai DE (2006) Management of patients with post-transplant lymphoproliferative disorder: the role of rituximab. *Transpl Int* 19:259–269
19. Choquet S, Oertel S, Leblond V et al (2007) Rituximab in the management of post-transplantation lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation: proceed with caution. *Ann Hematol* 86:599–607
20. Webber S, Harmon W, Faro A et al (2004) Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) for refractory PTLD after pediatric solid organ transplantation: multicenter experience from a registry and from a prospective clinical trial. *Blood* 104:(Abstract 746)
21. Stevens SJ, Verschuuren EA, Pronk I et al (2001) Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk. *Blood* 97:1165–1171
22. Merlino C, Cavallo R, Bergallo M et al (2003) Epstein Barr viral load monitoring by quantitative PCR in renal transplant patients. *New Microbiol* 26:141–149
23. Orentas RJ, Schauer DW Jr, Ellis FW et al (2003) Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. *Pediatr Transplant* 7:305–314
24. Yang J, Tao Q, Flinn IW et al (2000) Characterization of Epstein-Barr virus-infected B cells in patients with posttransplantation lymphoproliferative disease: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood* 96:4055–4063

Curriculum Vitae

Nome : Alex Sandro Correa Machado

Nascimento : 11/03/1981

Naturalidade: Rio de Janeiro

➤ **Formação Acadêmica**

- Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro, março de 2006
- Aperfeiçoamento em Pesquisa pelo Instituto Nacional de Câncer, março 2007
- Mestrado em Química Biológica no Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, setembro de 2009

➤ **Orientações de Estudante**

- Marcela Cristina Robaina – Iniciação científica, desde março de 2008

➤ **Comunicações em Congresso**

- 5 comunicações em congressos Nacionais
- 2 comunicações em congressos internacionais

➤ **Publicações**

- MACHADO, A S C, APA, A. G., de RESENDE, L.M, AMOEDO, N. D., RUMJANECK, F. D., KLUMB, C. E. Plasma Epstein-Barr viral load predicting response after chemotherapy for post-transplant lymphoproliferative disease. *Clinical and Experimental Medicine.* , v.8, p.129 - 132, 2008

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)