



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

YENSY MARIANA ZELAYA ROSALES

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS PD-1, PD-L1 E
CTLA-4 EM PACIENTES COM LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO**

FORTALEZA - CE

2023

YENSY MARIANA ZELAYA ROSALES

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS PD-1, PD-L1 E
CTLA-4 EM PACIENTES COM LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO**

Trabalho apresentado a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro
Gonçalves Lemes

Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Barroso
Duarte

Co-Orientador.: Dr^a. Maria da Silva
Pitombeira

FORTALEZA - CE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Z51e Zelaya Rosales, Yensy Mariana.

Estudo da Expressão dos Marcadores Imunológicos PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em pacientes com Linfoma de Hodgkin Clássico / Yensy Mariana Zelaya Rosales. – 2023.

116 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientação: Profa. Esp. Dr. Fernando Barroso Duarte e a Dra. Maria da Silva Pitombeira.

1. Linfoma de Hodgkin. 2. Checkpoint. 3. Imuno-histoquímica. 4. Sobrevida global. 5. Sobrevida livre de doença. I. Título.

YENSY MARIANA ZELAYA ROSALES

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS PD-1, PD-L1 E
CTLA-4 EM PACIENTES COM LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO**

Trabalho apresentado a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmácia

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando Barroso Duarte
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Maria do Patrocínio Ferreira Grangeiro Beco
Instituto do Cancer do Ceara (ICC)

Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Morais
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão eterna primeiro a Deus, por nunca me abandonar e ser misericordioso. Gratidão à minha família, especialmente a minha mãe, Mirian Rosales, que sempre me apoiou com seu amor incondicional e ao meu pai, Mario Zelaya, que sou seu orgulho e minhas irmãs, irmão e sobrinhos (Melisa, Tania, Mariela, Marito, Madsvin e Fernando) que são meus conselheiros e apoiaram. E acima tudo para minha avó MIMI que me espera com sua promessa de amor.

Sempre serei grata à minha orientadora Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, que sempre esteve ciente, não só de meu estado na faculdade, mas também por sua orientação em minha vida pessoal, e ao meu co-orientador Dr. Fernando Barroso Duarte, por sua paciência e compreensão por estar em um país estrangeiro, com outra língua.

Aos meus amigos hondurenhos, mas principalmente às minhas amigas brasileiras (Juliene Lima e Yhasmine Delles) que foram um tesouro de convivência e aventuras.

Aos membros do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética dos Estudos Hematológicos (LPHGDH-UFC) pela colaboração na pesquisa.

Aos funcionários histopatológicos de Ciências Morfofuncionais (PCMF- NEMPI) (Dra. Gerly Anne de Castro Brito e Adalberto Nascimento de Lima Junior) pelo apoio e condução nas análises dos experimentos, autoridades do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) pelo apoio no ambulatório, colaboradores da setor de Patologia pelo apoio ao recolher os dados dos prontuários médicos e materiais necessários à investigação.

As médicas hematologistas Dra. Acy Telles, Dra. Jacqueline Holland e Dra. Clara Bastos pelo excelente atendimento ambulatorial para Linfoma de Hodgkin.

E um agradecimento especial e uma menção à fundação CAPES que sem seu apoio financeiro este sonho seria impossível, assim como à Organização dos Estados Americanos (OEA) por promover este tipo de ajuda.

*Dedicado a MIMI, a promessa da espera
do retorno e o pacto de amor com Deus.*

RESUMO

O Linfoma de Hodgkin (LH) inicia-se no sistema linfático, conjunto composto por órgãos e tecidos que produzem as células responsáveis pela imunidade e vasos que conduzem essas células através do corpo. As proteínas do checkpoint imune encontram-se superexpressas no LH. Neste sentido, a expressão tumoral de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CTLA-4 pode emergir como um potencial biomarcador preditor de resposta à imunoterapia no LH. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão das proteínas PD-1, PDL-1 e CTLA-4 em pacientes com LH associando aos marcadores clínicos, com escores prognósticos e tratamento. Trata-se de um estudo de natureza quantitativa e corte retrospectivo dos pacientes com diagnóstico histopatológico de LH. Foram selecionados um total de 52 pacientes com LH, os critérios de inclusão foram pacientes com tratamento oncológico realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), adultos, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos diagnosticados no período de 2015 a 2019. Os dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais foram obtidos nos prontuários médicos. Para a análise da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi realizada a técnica de imuno-histoquímica de forma automatizada utilizando biópsia de linfonodo de pacientes com LH. A maioria dos pacientes tinham menos de 29 anos (67,31%), sexo feminino (55,77%) e sexo masculino (44,23%), o estágio clínico mais prevalente foi estágio II (40,38%), o tipo de sintomatologia foi B (76,92%), A maioria de LH foi EN (73,08%) e CM (19,23%). O IPS de bom prognóstico com pontuações 2 e 3 (71,15%). A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA4 foi positiva em 50%, 86,54% e 75% na biópsia de linfonodo de pacientes com LH. Quanto a intensidade de marcação a 21,15% apresentaram marcação forte da proteína PD-1, 36,46% apresentaram marcação forte de PD-L1 e para CTLA4 a maioria dos pacientes 36,54% apresentaram marcação fraca dessa proteína. Nas análises de associação da expressão das proteínas com as variáveis sociodemográficas e clínicas, não observamos associação do sexo e idade com a expressão positiva de PD-1, PD-L1 e CTLA4 ($p > 0,05$). A expressão proteica aumentada de PD-1 mostrou associação com a resposta completa ao primeiro tratamento ($p = 0,042$) e com a não necessidade de segunda terapia ($p = 0,008$). A expressão positiva de PD-L1 associou com o uso exclusivo de ABVD ($p = 0,046$) e a expressão positiva de CTLA4 associou com o não comprometimento do mediastino ($p = 0,049$), com a resposta completa ao segundo tratamento ($p = 0,023$) e com a resposta completa na condição final do paciente com LH ($p = 0,045$). A expressão positiva de PD-1 com intensidade moderada de marcação associou com menor sobrevida livre de progressão (SLE) com mediana de 1,53 anos tanto para as análises de até 10 anos ($p = 0,0001$) como para análises de 5 anos ($p = 0,00027$). Não observamos associação entre a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com a menor sobrevida global (SG). Conclui-se que ao diagnóstico houve um aumento da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em pacientes com LH e que as mesmas estão associadas com associação com variáveis clínicas e a sobrevida livre de doença (SLE), reforçando o potencial biomarcador dessas proteínas no tratamento e no prognóstico dos pacientes com LH.

Palavras-chave: Linfoma de Hodgkin, Checkpoint, Imuno-histoquímica, Sobrevida global, Sobrevida livre de doença.

ABSTRACT

Hodgkin's Lymphoma (HL) originates in the lymphatic system, a complex made up of organs and tissues responsible for the production of immune cells and vessels that transport these cells throughout the body. Immune checkpoint proteins are overexpressed in HL. In this context, the tumor expression of PD-1, PD-L1, PD-L2, and CTLA-4 may emerge as potential predictive biomarkers for immunotherapy response in HL. The study aimed to evaluate the expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 proteins in HL patients, correlating them with clinical markers, prognostic scores, and treatment. This is a quantitative and retrospective study of patients with a histopathological diagnosis of HL. A total of 52 HL patients were selected based on criteria, including undergoing oncological treatment at Walter Cantídio University Hospital (HUWC), being adults of both genders, aged 18 or older, diagnosed between 2015 and 2019. Sociodemographic, clinical, and laboratory data were obtained from medical records. Immunohistochemistry using automated techniques with lymph node biopsies from HL patients was employed to analyze the expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 proteins. Most patients were under 29 years old (67.31%), with 55.77% females and 44.23% males. The most prevalent clinical stage was Stage II (40.38%), and the B type of symptomatology was predominant (76.92%). The majority had nodular sclerosis (73.08%) and mixed cellularity (19.23%). A good prognostic IPS with scores 2 and 3 was observed in 71.15% of cases. Protein expression was positive in 50%, 86.54%, and 75% in HL patient lymph node biopsies. Regarding the intensity of marking, 21.15% showed strong PD-1 protein marking, 36.46% showed strong PD-L1 marking, and for CTLA4, the majority of patients (36.54%) had weak marking of this protein. In the analysis of protein expression association with sociodemographic and clinical variables, no association was observed between gender and age with positive expression of PD-1, PD-L1, and CTLA4 ($p > 0.05$). Increased protein expression of PD-1 was associated with a complete response to the first treatment ($p = 0.042$) and no need for a second therapy ($p = 0.008$). Positive PD-L1 expression was associated with exclusive ABVD use ($p = 0.046$), and positive CTLA4 expression was associated with no mediastinal involvement ($p = 0.049$), a complete response to the second treatment ($p = 0.023$), and a complete response in the final condition of the HL patient ($p = 0.045$). Positive PD-1 expression with moderate marking intensity was associated with shorter progression-free survival (PFS) with a median of 1.53 years for both analyses up to 10 years ($p = 0.0001$) and 5 years ($p = 0.00027$). No association was observed between PD-1, PD-L1, and CTLA-4 expression with overall survival (OS). In conclusion, there was an increase in the expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 proteins at diagnosis in HL patients, and these were associated with clinical variables and disease-free survival (DFS), reinforcing the potential biomarker role of these proteins in the treatment and prognosis of HL patients.

Keywords: Hodgkin's Lymphoma, Checkpoint, Immunohistochemistry, Overall survival, Survival free of doença.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

9p24.1	Região que inclui os genes CD274 (codifica PD-L1,2)
ABVD	Doxorrubicina, Bleomicina, Vimblastina, Dacarbazina
ALCL	Linfoma anaplásico de grandes células antígeno (B7- DC)(B7-H1)
BEACOPP	Bleomicina, adriamicina, ciclofosfamida, procarbazona e prednisona
CBC	Hemograma completo
BV CSCs	Brentuximabe vedotin Células-tronco tumorais
CD15	Grupo CD15 de diferenciação 15s (CD15s)
CD20	Antígeno de linfócito CD20 ou CD20 B
CD30	marcador tumoral e de receptor de fator de necrosetumoral TNFRSF8, CD30, D1S166E, Ki-1
CD45	A proteína tirosina fosfatase, tipo de receptor C
CD79a +	Glicoproteína (MB-1, Igα)
CDF	Células dendríticas foliculares celular, imunitária
CG	Centro germinativo
c-Jun	Principal componente de transcrição de AP-1
CM	Celularidade Mista
CTLA-4	Proteína T-linfócito-associada citotóxico 4 / CD152
DHAP	Cisplatina, citarabina e dexametasona
DL	Depleção Linfocitária
EBV	Vírus Epstein-Barr
EFRT	Radioterapia de campo estendido
EMA	Antígeno de Membrana Epitelial
SSEA-1	Antígeno embrionário estágio-específico 1.
EN	Esclerose Nodular
ESHAP	Etoposideo, metilpredsona, cisplatina, citarabina
FMC7	Glicoproteína transmembrana, Anticorpos FMC7
GVD	Gencitabina, Vinorelbina, doxorrubicina lipossomal
GVHD	Doença do enxerto contra o hospedeiro
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano
HUS	Síndrome Urêmica Hemolítica
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
ICE	Ifosfamida, carboplatina e etoposideo
ICIs	inibidores de checkpoint imunológico
IFRT	Radioterapia de campo reduzido
IgG4	Imunoglobulina G4
IHC	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPS	Índice de Prognóstico Internacional
LBRCTH	Linfoma b rico em células t / rico em histiócitos
LDH	Lactato Desidrogenase
LH	Linfoma de Hodgkin
LHc	Linfoma de Hodgkin Clássico
LHCEN	Linfoma de Hodgkin clássico esclerose nodular
LHNPL	Linfoma Nodular com Predominância Linfocitária

LTP	Linfoma t periférico
mAb	Anticorpo monoclonal
MOPP	Mecloretamina, vincristina, procarbazona e prednisona
mTOR	Proteína de controle celular, divisão e sobrevivência
NF-κB	HIFs ou NF-κB grupo de proteínas de controle
NR	Não Responde
NK	Natural killer
NSCLC	Câncer de pulmão de não pequenas células
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD	Progressão de doença
PD-1	Proteína morte programada 1
PD-L1	Ligante da proteína da morte programada 1
PD-L2	Ligante da proteína da morte programada 2
PDLs	Ligantes de morte programada
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PI3K / PTEN / AKT	Via de sinalização PTPRC
QT	Quimioterapia
RAS/RAF/MAPK-ERK	Via de sinalização RAS/RAF/MAPK-ERK
RC	Resposta completa
RL	Rico em linfócitos
RP	Resposta parcial
RS	Reed-Sternberg
RxT/RT	Radioterapia
SG	Sobrevivência global
SIM	Sistema de informação de mortalidade
SLE	Sobrevivência livre de doença
SLE	Sobrevivência livre de
SSEA-1	Antígeno embrionário específico de estágio-1
STANFORD-V	Doxorrubicina, bleomicina, vimblastina, mecloretamina
STAT1	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1
STAT3	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3
TC	Tomografia computadorizada
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas(Autólogo)
TILS	Linfócitos infiltrantes tumorais
TTP	Teste do tempo parcial de tromboplastina
VHS	Velocidade de hemossedimentação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.A - Distribuição de frequências das variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com LH coletados no período 2015-2019.	54
Tabela 1.B - Distribuição de frequências das variáveis clínicas dos pacientes com LH coletados no período 2015-2019.	55
Tabela 2.A - Distribuição de frequências das variáveis relativas a 1ª e 2ª abordagem terapêutica dos pacientes coletados no período 2015-2019.	57
Tabela 2.B - Distribuição de frequências das variáveis relativas a 2ª recidiva, tempo de recidiva, TMO, SG, condição e IPS dos pacientes coletados no período 2015-2019.....	58
Tabela 3 - Distribuição de frequências da expressão das proteínas CTLA-4, PD-L1 e PD-1 dos pacientes com LH coletados no período 2015-2019.....	60
Tabela 4 - Associação do perfil de expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com as características sociodemográficas dos pacientes com LH.	61
Tabela 5 - Variáveis clínicas e complicações vs proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 dos pacientes coletados no período 2015-2019.....	63
Tabela 6 - Associação da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com as variáveis imunofenotípicas, primeiro tratamento com ABVD, somente ABVD e RTX no pacientes com LH.....	66
Tabela 7 - Associação da expressão dos referentes a abordagem terapêutica vs as proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 dos pacientes com LH.....	69
Tabela 8 - Recidiva, tempo de recidiva, TMO, SG e condição vs proteínas PD-1, PD-L1 E CTLA-4 dos pacientes com LH no período 2015-2019.	70
Tabela 9 - IPS vs proteínas PD-1, PD-L1 E CTLA-4 dos pacientes coletados com LH no período 2015-2019.	73
Tabela 10 - Probabilidade de sobrevida dos pacientes.....	110
Tabela 11 - Probabilidade de sobrevida dos pacientes, separado por classificação CTLA-4.	111
Tabela 12 - Probabilidade de sobrevida dos pacientes, por classificação PD-L1.	112
Tabela 13 - Probabilidade de sobrevida dos pacientes, por classificação PD-1.	113
Tabela 14 - Probabilidade de sobrevida dos pacientes, separado por CTLA-4, PD-L1 E PD-1, considerando a classificação positivo e negativo.....	114

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de sobrevida livre de resposta (SLE) de Kaplan-Meier dos pacientes, com intervalo de confiança de 95%. (até 10 anos).....	75
Gráfico 2 - Curva de sobrevida livre de resposta (SLE) de Kaplan-Meier dos pacientes, com intervalo de confiança de 95% (até 5 anos).....	75
Gráfico 3 - Gráfico 3 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por CTLA-4 (até 10 anos).....	76
Gráfico 4 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por CTLA-4 (até 5 anos).....	76
Gráfico 5 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-L1 (até 10 anos).....	78
Gráfico 6 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-L1 (até 5 anos).....	78
Gráfico 7 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-1 (até 10 anos).....	79
Gráfico 8 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-1 (até 5 anos).....	79
Gráfico 9 - Curva de sobrevida livre de progressão de Kaplan-Meier dos pacientes separados por CTLA-4, PD-L1 e PD-1 (até 10 anos).....	80
Gráfico 10 - Curva de sobrevida livre de progressão de Kaplan-Meier dos pacientes separado por CTLA-4, PD-L1 E PD-1 (até 5 anos).....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características morfológicas e celulares do linfoma de Hodgkin.	21
Figura 2 - Comprometimento na classificação do estadiamento no Linfoma de Hodgkin.	25
Figura 3 - Estadiamento de Ann Arbor modificado por Cotswolds.	25
Figura 4 - Sistema de estadiamento de Lugano para LH.	26
Figura 5 - Índice Prognóstico Internacional (IPS) no Linfoma de Hodgkin.	27
Figura 6 - Reduções em 5 anos de liberdade de progressão e sobrevida geral em relação à pontuação no índice prognóstico internacional.	28
Figura 7 - Critérios de Deauville para PET provisório com F fluorodeoxiglicose.	28
Figura 8 - Regulação da ativação dos linfócitos T pela expressão de CTLA-4.	31
Figura 9 - Mecanismo de bloqueio PD-1/PD-L1.	33
Figura 10 - Interação de (PD1/PD-L1) ou bloqueio de antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA4).	34
Figura 11 - Controle transcricional e pós-transcricional de PD-L1 no câncer.	36
Figura 12 - Esquema do eixo PD-L1/PD-1 na citotoxicidade de células natural killer (NK).	37
Figura 13 - Fluxograma de coleta de dados.	45
Figura 14 - Fluxograma Geral com os tempos da seleção de pacientes ao análises de lâminas de Imuno-histoquímicas.	46
Figura 15 - Procedimento desde a coleta da amostra até a análise das expressões.	47
Figura 15 - Figura 16 - Pontuação da Imunorreação.	49
Figura 17 - Marcação da expressão PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em LHc.	50
Figura 18 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	98
Figura 19 - Formulario de Coleta de Dados.	100
Figura 20 - PD-1.	102
Figura 21 - PD-L1.	104
Figura 22 - CTLA-4.	105
Figura 23 - Diferenças de intensidade em uma mesma análise de expressão do PD-L1.	107
Figura 24 - Centro germinativo do PD-L1 e CTLA-4.	108
Figura 25 - Super marcação PD-L1.	109

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1.1 Inícios do linfoma de Hodgkin clássico (LHc)	17
1.2 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO.....	18
1.2.1 Linfoma de Hodgkin clássico esclerose nodular (EN/LHCEN/NSHL)	19
1.2.2 Linfoma de Hodgkin clássico celularidade mista (CM/ MCHL)	19
1.2.3 Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos (RL/ LRHL)	19
1.2.4 Linfoma de Hodgkin clássico depleção linfocítica (DL/ LHCDL/LDHL)	20
1.2.5 Linfoma de Hodgkin de predomínio linfocítico nodular (RL/ LHPLN/LRHL) ..	20
1.3 DIAGNÓSTICO	22
1.4 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS	22
1.5 ESTADIAMENTO	24
1.5.1 Classificação Lugano	25
1.6 PROGNÓSTICO	26
1.7 TRATAMENTO (TX).....	28
1.8 MECANISMOS DE EVASÃO IMUNE / VIAS PD-1, PD-L1 E CTLA-4 E A IMUNOTERAPIA NO LH	30
1.8.1 Natural Killer (NK)	36
1.9 DOENÇA RECIDIVANTE OU REFRATÁRIA E QUIMIOTERAPIA DE RESGATE E IMUNOTERAPIA.....	38
1.9.1 Fatores prognósticos quanto à sobrevida e fatores prognósticos quanto a sobrevida livre de doença	39
2 RELEVÂNCIA	40
3 JUSTIFICATIVA	41
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 TIPO DE ESTUDO	44

5.2 CASUÍSTICA.....	44
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	44
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	44
5.5 COLETA DE DADOS	46
5.6 ANÁLISES DA IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	47
5.7 ANÁLISES DA IMUNOHISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS PD-1, PD-L1 E CTLA-4.....	47
5.8 INTERPRETAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4	48
5.9 ESPECIFICAÇÕES DOS ANTICORPOS FORNECIDOS PELA BULA.....	50
5.9.1 PD-1	50
5.9.2 PD-L1	51
5.9.3 CTLA-4.....	51
5.10 ANÁLISE DOS DADOS	51
5.11 ASPECTOS ÉTICOS.....	52
6.RESULTADOS.....	53
6.1 PERFIL DOS PACIENTES SOCIODEMOGRÁFICO, CLÍNICO E TERAPÊUTICO (UNIVARIADA).....	53
6.2 ABORDAGEM SÓCIODEMOGRÁFICO, CLÍNICO E TERAPÊUTICO EM ASSOCIAÇÃO COM PD-1, PD-L1 E CTLA-4 (ANÁLISE BIVARIADA).....	61
6.3 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA EM ASSOCIAÇÃO COM PROTEÍNAS PD-1, PD-L1 E CTLA-4	74
7 DISCUSSÃO	81
8 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS	98

1 INTRODUÇÃO

O Linfoma ou doença de Hodgkin (LH) é um tipo de câncer que surge no sistema linfático, composto por órgãos (linfonodos ou gânglios) e tecidos que produzem as células responsáveis pela imunidade e vasos que conduzem estas células através do corpo (INCA, 2018; Momotow et al., 2021).

O LH tem incidência aumentada em adultos jovens, bem como em pacientes acima de 55 anos. No Estado do Ceará, a maioria dos casos de LH foram descritos na faixa infanto juvenil, aos 10 anos de idade e na fase adulta, em pacientes com idade menor que 49 anos (Monteiro et al., 2016).

Quanto a etiologia do LH, não existem fatores de risco claramente definidos para o desenvolvimento desta doença, mas acredita-se que o LH está associado a fatores genéticos, exposições virais e supressão imunológica (Ansell, 2022).

O mecanismo envolvido na supressão imune no LH, envolve a desregulação dos checkpoints imunes na ativação das células T. Os checkpoints imunes são receptores estimulatórios ou inibitórios que regulam a ativação das células T em diferentes momentos para manter a autotolerância imune. Dos checkpoints inibitórios temos o receptor de morte programa 1 (PD-1) e seu ligante (PD-L1) e o antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4). Em linfonodos esse mecanismo é desregulado devido a alta expressão dessas proteínas na superfície das células fazendo com que a regulação da ativação dos linfócitos seja ineficaz promovendo evasão do sistema imune favorecendo o tumor (Calado, 2019; Souza et al., 2021).

No LH, as células de Reed-Sternberg, células características do linfoma de Hodgkin, comumente superexpressam ligantes PD-L1 e diante disso a imunoterapia apresenta-se de forma promissora como uma alternativa de tratamento em pacientes refratários à quimioterapia. A imunoterapia com os inibidores do checkpoint imune (ICIs) anti PD-1, anti PD-L1 e anti- CTLA-4, bloqueiam a ligação dos receptores com seus respectivos ligantes e, com isso, o sistema imune consegue identificar e combater o câncer. Os ICIs têm demonstrado eficácia clínica em diversos tipos de tumores, bem como no LH (Sharma; Allison, 2015).

Portanto, avaliar a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 E CTLA-4 pode ser sugestivo para indicação do uso do ICIS, sugerindo uma melhor eficácia em relação a esse tipo de tratamento e evitando, assim, possíveis reações adversas contra a imunoterapia

(Teixeira et al., 2019; Reis et al., 2020).

A importância deste estudo foi a demonstração da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 associado a fatores clínicos, sociodemográficos, escore prognóstico e esquemas de tratamento para avaliar o fator indicativo de tratamento com ICIs para uma melhor qualidade de vida dos pacientes com LH. Contudo, enfatiza-se avaliar o impacto do nível de expressão dessas proteínas nos pacientes com LH do nordeste brasileiro.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Inícios do linfoma de Hodgkin clássico (LHc)

Os linfomas são um grupo de neoplasia (linfonodos) hematopoiéticas e, entre essas, está o linfoma de Hodgkin Clássico (LHc) que pertence a uma família de linfomas com características particulares. Os primeiros relatos dessa doença/patologia foram feitos por Thomas Hodgkin em 1832. Porém, foi somente em 1865 que Samuel Wilks, com o reconhecimento de novos casos e o trabalho de Hodgkin, deu nome "doença de Hodgkin" em homenagem ao seu descobridor, nome usado para mais de um século e atualmente denominado LH, de acordo com a atual classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), para neoplasias linfo- hematopoiéticas (Ávila et al., 2021).

Globalmente, estima-se que 83.087 pessoas foram diagnosticadas com LH em 2020. Estima-se que este ano ocorram 920 mortes (550 homens e 370 mulheres) devido a esta doença. A taxa de sobrevivência vem aumentando desde 1975 graças a melhorias no tratamento. De 2010 a 2019, a taxa de mortalidade diminuiu 4,5% ao ano. Em 2020, cerca de 23.376 pessoas em todo o mundo morreram de LH (Cancer Facts & Figures, 2022).

As estatísticas são estimativas calculadas de novos casos: 2.640, sendo 1.590 homens e 1.050 mulheres (2020 - INCA); e o número de mortes: 455, sendo 256 homens e 199 mulheres (2020 - Atlas De Mortalidade Por Câncer - SIM). Em países industrializados, têm sido descrito que a LH tem distribuição bimodal em relação à idade, com pico inicial aos 20 anos e o segundo pico por volta dos 50 anos. No Estado do Ceará, Brasil, os casos de LH foram mais descritos no grupo infanto-juvenil, aos 10 anos, e na fase adulta, nos menores de 49 anos. No Brasil, existem dados que registram a evolução do câncer em escala progressiva, caracterizando-o como um agravamento relevante em termos de saúde pública (Monteiro et al., 2016).

Dentre as características da doença, destaca-se o início precoce, as raras células malignas, que são grandes células multinucleadas derivadas de linfócitos B (conhecidas

como células de Hodgkin e Reed-Sternberg (HRS) e geralmente estão presentes em um microambiente rico em células efetoras imunes; e a elevada taxa de cura, mesmo quando o paciente apresenta quadro metastático avançado, além de uma boa sensibilidade à radioterapia (Connors et al., 2020; Cerchione et al., 2022).

A fisiopatologia do LH está cada vez mais compreendida. As HRS originam-se de células B do centro germinativo que perderam seu fenótipo de célula B devido a aquisição de mutações gênicas. Os eventos transformadores envolvidos na geração de células HRS são apenas parcialmente compreendidos, mas várias lesões genéticas envolvendo as vias de sinalização do fator nuclear κ B ou Jak-Stat, PI3K-Akt, Erk, AP1, notch 1 e receptores de tirosina quinases e de evasão imune são relacionados com a origem das células HRS (Takahara et al., 2022; Weniger et al., 2021; Momotow et al., 2021).

Além da sinalização desregulada das vias de sobrevivência intracelular e sinalização de proliferação, as células HRS requerem um microambiente celular peculiar (TME), extremamente inflamatório, que apoia sua sobrevivência e proliferação escapando dos ataques das células T citotóxicas ou NK (Takahara et al., 2022; Weniger et al., 2021; Momotow et al., 2021).

Portanto, com a combinação de tais lesões genéticas e múltiplas interações celulares no microambiente com a ativação constitutiva de muitas vias de sinalização, as células HRS surgem a partir das células mononucleares de Hodgkin como consequência da citocinese incompleta e da refusão das células-filhas (Takahara et al., 2022; Weniger et al., 2021; Momotow et al., 2021).

As células tumorais LH constituem apenas cerca de 5% da massa tumoral; em geral, o gene mais frequentemente mutado no LH é o STAT6 (Maco et al., 2022).

1.2 SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO / CLASSIFICAÇÃO DO LINFOMA DE HODGKIN

O LHc é responsável por aproximadamente 95% de todos os LH e é ainda subdividido em quatro subgrupos: esclerose nodular (LHEN), rico em linfócitos (LHRL), celularidade mista (LHCM) e depleção de linfócitos (LHDL) (Momotow et al., 2021). Os quatro subtipos de LHc diferem em suas características clínicas, padrão de crescimento, fibrose, composição do ambiente celular, número e grau de atipia de células de Reed-Sternberg (células RS) e frequência de infecção viral por Epstein-Barr. No entanto, o imunofenótipo das células tumorais (células RS) é o mesmo em todas as quatro variantes

(Torres; Hidalgo, 2009).

1.2.1 Linfoma de Hodgkin clássico esclerose nodular (EN/LHCEN/NSHL)

A esclerose nodular (EN) é um tipo histológico frequentemente encontrado em portadores de LH. Morfologicamente, o LHCEN pode ser diferenciado dos demais tipos devido à presença de bandas de fibrose que delimitam nódulos celulares (Pracchia et al., 2005).

O LHCEN, de origem linfoide da célula B do centro germinativo (CG), apresenta agregados de células dendríticas foliculares (CDF), HRS e variantes, células B formando complexos relacionados ao CG, sugerindo uma associação entre esclerose nodular e formação do centro germinativo (Almeida et al., 2006).

1.2.2 Linfoma de Hodgkin clássico celularidade mista (CM/ MCHL)

O LHCM corresponde a cerca de 15%-25% dos casos de LH. O fundo inflamatório é variado, composto por linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos. Os linfócitos T, assim como nos outros tipos clássicos constituem o infiltrado linfoide predominante e podem formar rosetas ao redor das células neoplásicas (Santos dos Reis, 2013).

1.2.3 Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos (RL/ LRHL)

O LRHL comumente mostra um padrão de crescimento nodular em um fundo inflamatório constituído predominantemente por linfócitos, com poucos ou nenhum eosinófilos e neutrófilos. Células RS e células mononucleares de Hodgkin estão geralmente presentes (Hattem; Hani, 2021). Este subtipo de LH representa 5% de todos os casos de LHc. Surge normalmente em indivíduos com mais de 50 anos de idade. Caracteriza-se por baixa agressividade e envolvimento preferencial de áreas infradiafragmáticas. A localização mediastínica ou extraganglionar e a presença de sintomas sistêmicos ou de massas volumosas são raras (Sá Machado et al., 2009).

A maioria dos casos têm estrutura morfológica formada por um “background” nodular, podendo ocorrer nos macrófagos – mesmo em apresentações epitelioides – com ausência de eosinófilos e neutrófilos. O fenótipo pode ajudar neste diagnóstico diferencial, já que no LHCRL as células neoplásicas são positivas para CD30+, CD15+ e menos frequentemente positivas para CD20+ (32,5%) e CD79a+ (32,5%). Ao contrário dos LHPLN, o EMA é positivo em poucos casos e não ocorre positividade para cadeia (Santos dos Reis, 2013)

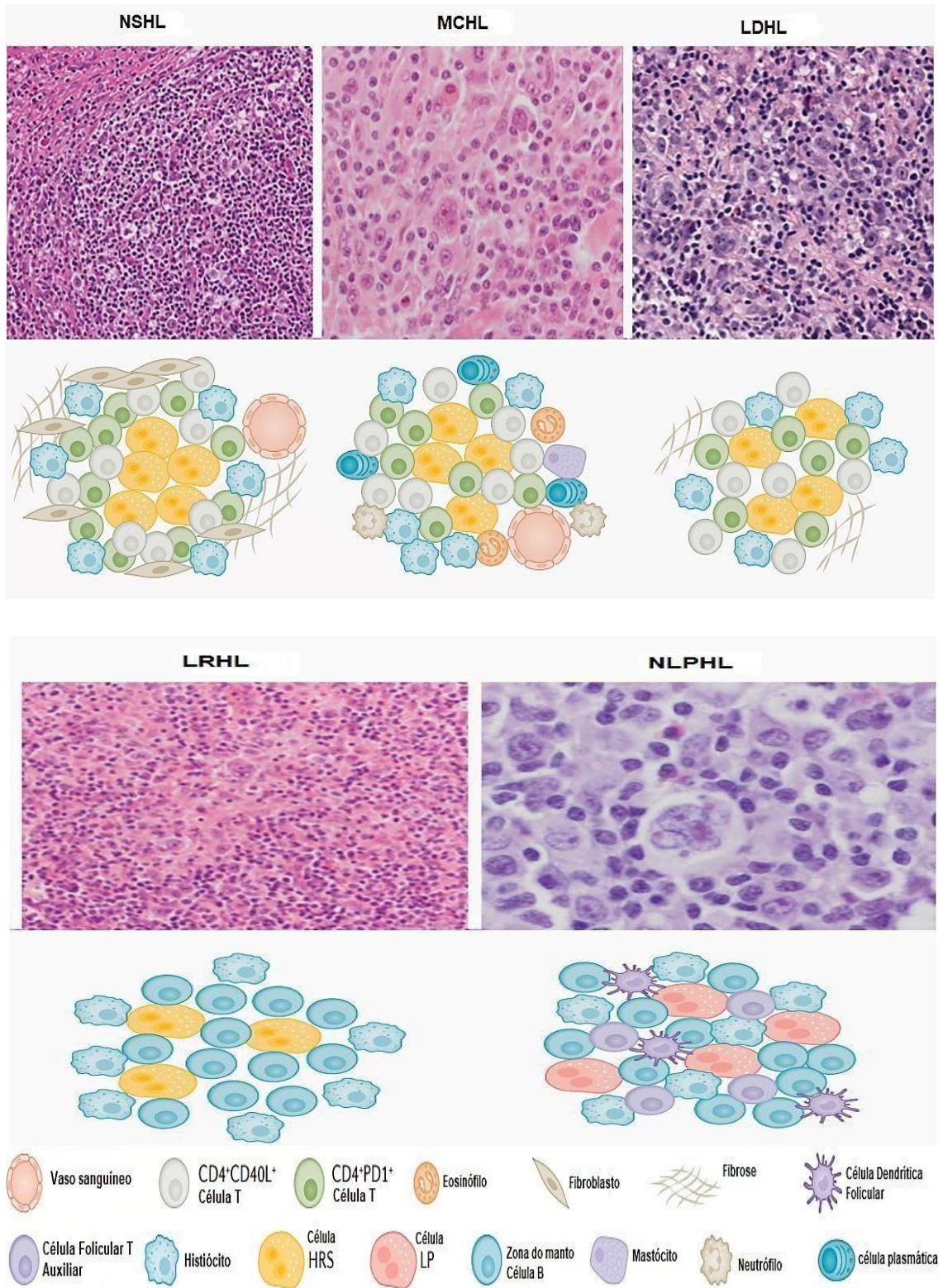
1.2.4 Linfoma de Hodgkin clássico depleção linfocítica (DL/ LHCDL/LDHL)

O LHCDL é um subtipo que se pode apresentar com um padrão de fibrose difusa ou, menos frequentemente, com um padrão reticular. Em qualquer dos casos, há uma alteração completa da arquitetura ganglionar. O primeiro, como o nome indica, caracteriza-se por uma fibrose densa e difusa (sem colágeno birrefringente), podendo também existir áreas de necrose. Há um predomínio de células de HRS, sendo rara, se ocorrer, a presença de células não-neoplásicas inflamatórias e acessórias. Nos países desenvolvidos o LHCDL é o subtipo menos comum, apresentando maior incidência nos países em desenvolvimento. Ocorre preferencialmente nos idosos (Sá Machado et al., 2009). Nos casos de LH que regularmente, compromete gânglios periféricos e retroperitoneais, baço e medula óssea em mais de 50%, associando uma febre intermitente, sudorese noturna e perda de peso. As estatísticas demonstram certa associação preferencial deste subtipo nos adultos idosos (Carballo, 2011).

1.2.5 Linfoma de Hodgkin de predomínio linfocítico nodular (RL/ LHPLN/LRHL)

Uma minoria de pacientes, aproximadamente 10%, apresenta LHPLN, no qual um microambiente de linfócitos maduros é pontuado por células malignas (linfócitos predominantemente (LP), células grandes que expressam antígeno de linfócito B (CD20) (Connors et al., 2020). Dada a excelente sobrevida a longo prazo e a idade jovem de apresentação, os efeitos tardios do tratamento devem ser cuidadosamente considerados. O LHPLN é um subtipo que possui uma aparência histológica distinta do LHc. Há um desaparecimento da normal arquitetura ganglionar, na maior parte dos casos, não existem centros germinativos ativos residuais. Geralmente apresenta um padrão de crescimento nodular, que pode ou não ser acompanhado de áreas difusas, muito raramente encontra-se um padrão de crescimento difuso puro. Os nódulos são basicamente áreas de células B próximas de centros germinativos em transformação progressiva. Pelo contrário, no tipo difuso encontram-se sobretudo células T. Não são detectadas células de HRS (Sá Machado et al., 2009; Cliquet et al., 2019).

Figura 1 - Características morfológicas e celulares do linfoma de Hodgkin.



Fonte: Connors J. M. et al., 2020.

Nota: Características morfológicas e celulares do LH, microambiente tumoral (TME) dos quatro subtipos de linfoma de Hodgkin clássico (LHc) e o linfoma de Hodgkin com predominância de linfócitos nodulares (NLPHL). O TME em LHc demonstra uma celularidade variável que é diferente em cada subtipo. No LH da esclerose nodular (NSHL), o TME é especificamente caracterizada por células semelhantes a fibroblastos e fibrose. No linfoma de Hodgkin de celularidade mista (MCHL), o TME consiste em um infiltrado reativo polimorfo com células B e células T, neutrófilos, histiócitos, plasma células e mastócitos. No linfoma de Hodgkin com depleção de linfócitos (LDHL), o TME geralmente é composto por histiócitos e fibrose irregular. No linfoma de Hodgkin rico em linfócitos (LRHL), o TME é variável, mas geralmente consiste em histiócitos e linfócitos. O TME da NLPHL é semelhante ao LRHL, embora no NLPHL seja rico em células dendríticas foliculares. HRS, Hodgkin e Reed–Sternberg; LP, predominantemente linfocitário. (Connors J. M. et al., 2020) (ampliação original ×20 e 40x)

1.3 DIAGNÓSTICO

Os pacientes normalmente procuram um médico após verificarem aparecimento de gânglios aumentados no pescoço, axilas ou virilha, aos quais geralmente não são dolorosos e não respondem ao tratamento com antibióticos.

Apresentam febre, suores noturnos, perda de peso não intencional (mais de 10% do peso corporal nos seis meses anteriores), esplenomegalia, hepatomegalia podem estar presente, a caquexia é comum com o avanço da doença (Barbery Gómez et al., 1993).

O diagnóstico do LH é feito através da biópsia de um linfonodo ou órgão suspeito. E a célula R-S ou célula LP (Na recente classificação da OMS-2008 células polilobadas ou roseta de milho) precisa ser identificada na amostra de biópsia para estabelecer um diagnóstico definitivo. A investigação adicional é essencial para determinar o estágio, que orienta o tratamento e fornece informações prognósticas (Kasb et al., 2022).

Exames laboratoriais incluem hemograma (CBC), painel metabólico completo (CMP), velocidade de hemossedimentação (VHS), vírus da hepatite B, vírus da hepatite C e HIV e dosagem de citocinas séricas IL 6, IL 10 e CD 25 solúveis são essenciais e correlacionam-se com sintomas sistêmicos e prognóstico

A radiografia de tórax, TC de tórax/abdômen/pelve e PET/TC podem ajudar no estadiamento. A PET-TC agora se tornou um teste padrão para avaliação da resposta ao tratamento no LH e na maioria dos linfomas. No geral, uma avaliação abrangente é essencial tanto para o diagnóstico quanto para o estadiamento do LH (Kasb et al., 2022; Martin; Leonard, 2018; 2022).

1.4 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

O diagnóstico do LHc é baseado na identificação morfológica da célula R-S (ou

suas variantes) e do ambiente inflamatório celular, e no imunofenótipo das células. Por imuno-histoquímica, a definição diagnóstica do LHc é que as células R-S são positivas para CD30, CD15 e negativas para CD45 e EMA e, às vezes, positivas para marcadores B (vide-infra). Os linfócitos que circundam essas células são linfócitos T (a maioria são CD4 +) (Lara-Torres; Ortiz-Hidalgo, 2009).

A imunomarcção, além de ajudar no diagnóstico preciso de LH, tem contribuído para diferenciá-lo de várias entidades com as quais pode ser confundido histologicamente, como linfoma T periférico (LTP), linfoma B rico em células T / rico em histiócitos (LBRCTH), linfoma mediastinal primário de grandes células B (tímico), linfoma anaplásico de grandes células (ALCL), linfadenopatia reativa de origem viral (mononucleose infecciosa), metástases (melanoma, tumor de células germinativas e alguns sarcomas (Lara-Torres; Ortiz-Hidalgo, 2009).

O marcador CD15 foi identificado como um marcador endotelial de imaturidade durante a investigação da função hematopoiética por ser expresso em leucócitos maduros, especialmente células da linhagem mieloide (Ravikumar et al., 2019).

A expressão de CD15 no LH é bastante variável e varia de 35% a 90% em diferentes estudos; seu padrão de expressão pode ser paranuclear (correspondendo à região de Golgi), citoplasmático difuso e / ou predominante na membrana celular (Cozzolino et al., 2020). É um marcador de mau prognóstico na leucemia promielocítica aguda. Pode ajudar a definir células-tronco neurais (Gauchotte et al., 2013). Na rotina, o marcador de CD15 é usada para confirmar o diagnóstico ou para diferenciar o LH CD15 + do linfoma anaplásico de células grandes (geralmente CD15-) e marcador de granulócitos (Cozzolino et al., 2020).

O marcador CD20 é encontrado em células B maduras saudáveis, logo na fase pró-B, bem como na leucemia linfocítica crônica, LPHL e em alguns casos de LHc. (Santos; de Moraes Lima, 2017).

A presença de expressão de CD20 no LH com predomínio de linfócitos e algumas apresentações de LHc apoiam a hipótese de que as células HRS derivam de células B do centro germinativo no estágio de centroblasto (Florou et al., 2020). O rituximabe é um anticorpo anti-CD20 humano murino quimérico usado para tratar linfomas de células B; o tratamento pode causar a seleção de subclones tumorais CD20 negativos (CD79a +)

(Delgado et al., 2003). As alterações na morfologia e na expressão de CD20 após a terapia com rituximabe variam amplamente (Maeshima et al., 2013; Grimm et al., 2013).

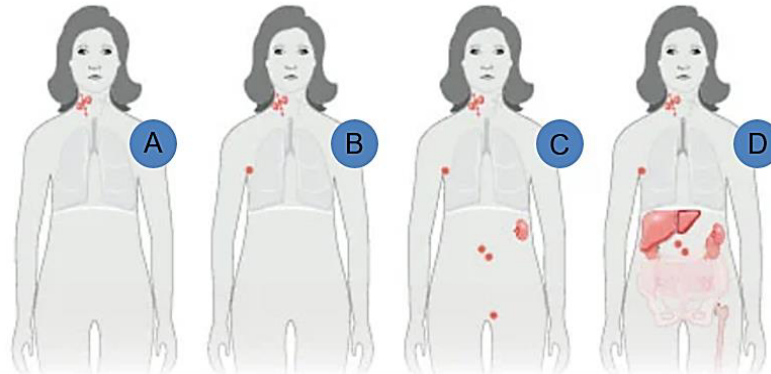
O antígeno CD20 pode ser expresso por células reativas ou linfomatosas de micose fungoide transformada (Jullié et al., 2013); também outros linfomas de células T, sendo um marcador de célula B comumente usado (Baiyee; Natkunam, 2009).

O CD30 é um receptor de superfície celular expresso no LHc, no linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) e em muitos outros linfomas em grau variável. Foi identificado como um importante alvo terapêutico no linfoma. O teste de CD30 é essencial no diagnóstico de LHc e ALCL, e a expressão também pode ser observada em outros subtipos de linfoma. O brentuximabe vedotin (BV), um conjugado anticorpo-droga direcionado ao CD30, tem sido um importante avanço no tratamento do linfoma (Pierce; Mehta, 2017). Além disso, o CD30v é uma forma variante de CD30 que retém apenas o domínio citoplasmático; muito pouco foi publicado sobre CD30v; também conhecido como Ki-1, Ber-H2 (Ramos et al., 2020).

1.5 ESTADIAMENTO

O estadiamento do LH refere-se principalmente ao prognóstico, mas também influencia muito na quantificação e qualificação do tratamento a ser utilizado e, portanto, precisa ser cuidadosamente avaliado em cada paciente. Em uma revisão bibliográfica nacional foi observado que, de um modo geral, ocorre um diagnóstico tardio do LHc no Brasil, com a maioria dos pacientes já encontrando-se em estágios avançados da doença ao diagnóstico (Rabelo et al., 2022).

Figura 2 - Comprometimento na classificação do estadiamento no Linfoma de Hodgkin.



Fonte: ABRALÉ

Nota: A: Estágio I, B: Estágio II, C: Estágio III, D: Estágio IV.

Figura 3 - Estadiamento de Ann Arbor modificado por Cotswolds.

Estágio I: Envolvimento de um linfonodo isolado ou uma estrutura linfóide (ex.baço, timo, anel de Waldeyer).

Estágio II: Envolvimento de dois ou mais linfonodos no mesmo lado do diafragma (o mediastino é um sítio singular, linfonodos hilares são lateralizados). O número de sítios anatômicos deve ser indicado por um sufixo (ex. II3).

Estágio III: Envolvimento de linfonodo ou de estruturas em ambos os lados do diafragma
 III1: Com ou sem linfonodos do hilo esplênico, celíaco ou portal III2: com linfonodos para-aórtico, ilíaco ou mesentérico

Estágio IV: Envolvimento de sítio extranodal, designado por "E" **A: Sem sintomas**

B: Febre, perda de peso e sudorese

X: Extensão da doença > 1/3 do diâmetro do mediastino > 10 cm de extensão máxima da massa nodal

E: Envolvimento de um sítio extranodal, contíguo ou próximo de um outro conhecido

EC: Estágio clínico

EP: Estágio patológico

Fonte: Lister et al., 1989; Rabelo et al., 2022.

1.5.1 Classificação Lugano

Após a realização da 11^a e 12^a Conferência Internacional sobre linfomas em Lugano, Suíça, em 2011 e 2013, respectivamente, foi alcançado um acordo sobre o uso de PET/CT para estadiamento e os critérios de resposta em linfoma foram revisados, ávidos por FDG, na prática clínica e em ensaios clínicos; eles são os chamados endpoints de resposta de Lugano. Os principais consensos alcançados foram: i) a 18F-FDG

PET/CT foi formalmente incorporada no estadiamento dos linfomas ávidos por FDG; ii) a biópsia de medula óssea não é mais indicada no estadiamento de rotina de pacientes com LH e na maioria dos pacientes com linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), e iii) a avaliação da resposta ao tratamento será feita por PET/CT utilizando os 5 escala de pontos e a classificação de Lugano (Tamayo et al., 2017).

Segundo a Leukemia & Lymphoma Society (2022), o estadiamento do LH é baseado na classificação de Lugano, que é derivada do sistema de estadiamento de Ann Arbor. Essas classificações referem-se a cidades onde os especialistas em linfoma se reuniram desenvolver os sistemas e adotá-los para uso em pacientes.

Figura 4 - Sistema de estadiamento de Lugano para LH.

Estágio	Área de Envolvimento
I	As células do LH são encontradas em uma única região linfonodal.
IE	Localizados em um órgão ou local fora do sistema linfático.
II	Duas ou mais regiões de linfonodos do mesmo lado do diafragma, acima ou abaixo dele.
IIIE	Encontrados em uma área de linfonodo e um órgão próximo fora do sistema linfático, do mesmo lado do diafragma.
III	Encontradas em regiões de linfonodos em ambos os lados do diafragma (acima e abaixo), possivelmente com envolvimento localizado de um órgão fora do sistema linfático ou do baço.
IV	As células do LH se espalharam amplamente para um ou mais órgãos fora do sistema linfático; São encontrados em um órgão fora do sistema linfático e também em linfonodos distantes.

Fonte: (Leukemia & Lymphoma Society, 2022) NOTA: Além do número do estágio, as letras A, B, E ou S podem ser usadas para classificar ainda mais os estágios do LH. **Categoria A:** o paciente não apresenta sintomas B (incluindo febre, sudorese excessiva e/ou perda inexplicável de mais de 10% peso corporal durante um período de 6 meses). **Categoria B:** o paciente apresenta sintomas B. **Categoria E:** o paciente tem células de LH em órgãos ou tecidos fora do sistema linfático. **Categoria S:** o paciente tem essas células no baço.

1.6 PROGNÓSTICO

Vários fatores prognósticos têm sido identificados no LH: idade, sexo, sintomas sistêmicos, estágio clínico e patológico, número de áreas linfonodais comprometidas, envolvimento e extensão da doença mediastínica, aspectos histopatológicos, atípicas das células RS, número de células tumorais (expansão, crescimento, resistência e apoptose), elevação do VHS, número de linfócitos e de eosinófilos no sangue periférico, positividade dos marcadores linfóides CD15 e CD30, liberação de componentes da família do fator de

necrose tumoral, presença da célula dendrítica folicular e resposta à terapia. Uma classificação acurada das neoplasias hematopoéticas requer um suplemento imunohistoquímico, auxiliado por técnicas moleculares. Todos os subtipos do LHc têm o mesmo fenótipo, as células H/RS são positivas para o CD30 (Ber-H2) em aproximadamente 90% dos casos, para CD15 (Len-M1) em 75%-85% dos casos, para CD20 em 25% e negativas para EMA (Antígeno Epitelial de Membrana), CD45, CD43 (Almeida et al., 2006).

Fatores prognósticos do LH em estágio localizado (incluindo tumor bulky, número de regiões envolvidas, sintomas B, velocidade de sedimentação globular, idade avançada) que permitem adaptar o tratamento inicial. Na mudança, nos estágios avançados de LH, a massa tumoral e outros fatores prognósticos são menos preditivos de sobrevida (Pinochet et al., 2021)

A pontuação é calculada de acordo com sete fatores clínicos e laboratoriais (figura 8); a presença de cada fator reduz a sobrevida global em 5 anos em média em 8% (Figura 9). A estratificação de risco de acordo com a avaliação da resposta por F-FDG PET provisória na doença em estágio inicial e em estágio avançado provavelmente complementar ou substituirá os métodos atuais de atribuição de risco (Townsend; Linch, 2012).

Figura 5 - Índice Prognóstico Internacional (IPS) no Linfoma de Hodgkin.

International Prognostic Score - IPS	Pontuação
Albumina menor que 4g/dL	01
Hemoglobina menor 10,5 g/dL	01
Sexo masculino	01
Doença em estágio IV	01
Idade maior ou igual a 45 anos	01
Leucocitose (leucócitos \geq 15.000/mm ³)	01
Linfocitopenia (linfócitos <600/ mm ³)	01

Fonte: Hasenclever et al., 1998.

Figura 6 - Reduções em 5 anos de liberdade de progressão e sobrevida geral em relação à pontuação no índice prognóstico internacional.

	5 anos FFP (SE)	OS 5 anos (SE)
Pontuação 0	84%	89%
Pontuação 1	77%	90%
Pontuação 2	67%	81%
Pontuação 3	60%	78%
Pontuação 4	51%	61%
Pontuação ≥ 5	42%	56%

Fonte: Townsend; Linch, 2012; FFP = livre de progressão. OS = sobrevida global.

Existem várias questões não resolvidas relacionadas à reprodutibilidade e ao controle de qualidade da F-FDG PET e à interpretação padronizada da captação mínima. A quantificação da captação de F-FDG pode ser avaliada como um valor de captação padrão ou por avaliação visual. Para fins de ensaios clínicos, é recomendada uma escala de cinco pontos (escala de Deauville) que compara o valor de captação padrão de uma lesão com o do mediastino ou fígado (Townsend; Linch, 2012).

Figura 7 - Critérios de Deauville para PET provisório com F fluorodeoxiglicose.

Pontuação	Grau de captação
1	Sem captação
2	Captação \leq mediastino
3	Captação $>$ mediastino, mas \leq fígado * A pontuação 3 pode ser considerada positiva em estudos que investigam uma redução na terapia ou negativa em estudos que investigam a intensificação do tratamento
4	A captação aumentou moderadamente em qualquer local em comparação com o fígado
5	A absorção aumentou substancialmente em qualquer local em comparação como fígado, ou quaisquer novos locais de doença.

Fonte: INCA, et al., 2018

1.7 TRATAMENTO (TX)

O LH, na maioria dos casos, é uma doença curável quando tratado adequadamente. O tratamento clássico é a poliquimioterapia, quimioterapia com múltiplas drogas, com ou sem radioterapia associada. No momento do diagnóstico, dependendo do estágio da doença, pode-se estimar o prognóstico do paciente como tratamento. O esquema ou protocolo de quimioterapia utilizado de rotina no INCA é denominado ABVD. Esta sigla identifica as iniciais das medicações utilizadas no tratamento: A de “Adriamicina”, B de “Bleomicina”, V de “Vimblastina” e D de “Dacarbazina”. A quantidade de ciclos de quimioterapia dependerá da avaliação do

estádio inicial do tumor. Os pacientes podem ser classificados como portadores de doença localizada ou doença avançada (Brice, 2021). Para os pacientes que sofrem recaídas, ou seja, retorno da doença, ou que não respondem ao tratamento inicial, as alternativas vão depender da forma inicial de tratamento. As opções empregadas usualmente, e com indicações relativamente precisas, são a poliquimioterapia e o transplante de medula óssea. Os pacientes devem ser seguidos continuamente após o tratamento, com consultas periódicas, cujos intervalos podem ir aumentando progressivamente (Buglione et al., 2021).

O LH apresenta grande probabilidade de cura, e se torna mais provável se for diagnosticada e tratada em seus estágios iniciais. São necessários acompanhamento para avaliações periódicas por anos depois do tratamento para procurar e identificar por sinais do câncer e por quaisquer efeitos de longo prazo do tratamento (Longo; Armitage, 2022).

No geral, os resultados do tratamento são excelentes. No entanto, cerca de 10% a 5% dos pacientes em estágio avançado recaem, apenas cerca de 50% das recidivas são resgatadas e os resultados em pacientes com mais de 60 anos não são tão favoráveis. Felizmente, um arsenal de novas drogas está aparecendo no horizonte que, sem dúvida, resgatará mais pacientes e, provavelmente, alguns deles se tornarão parte dos esquemas (Mesquita, 2020).

No diagnóstico da progressão e da recaída torna-se necessário uma nova biópsia para verificar a ocorrência de mudança histológica entre outros exames para indicar o procedimento mais adequado. No tratamento após progressão ou recidiva para a 1ª linha. Após a quimioterapia de resgate, segue-se para o transplante autólogo, tratamento de escolha na LH refratária ou recidiva (Khan et al., 2022).

Para o LH refratário, têm sido avaliadas estratégias de terapia molecular dirigida, esse é o caso do brentuximab, um anticorpo anti-CD30. Assim como, os agentes imunológicos monoclonais específicos que demonstraram eficácia em tumores que expressam PD-1, como o pembrolizumab e Nivolumab aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) em 2014 (Sharma; Allison, 2022).

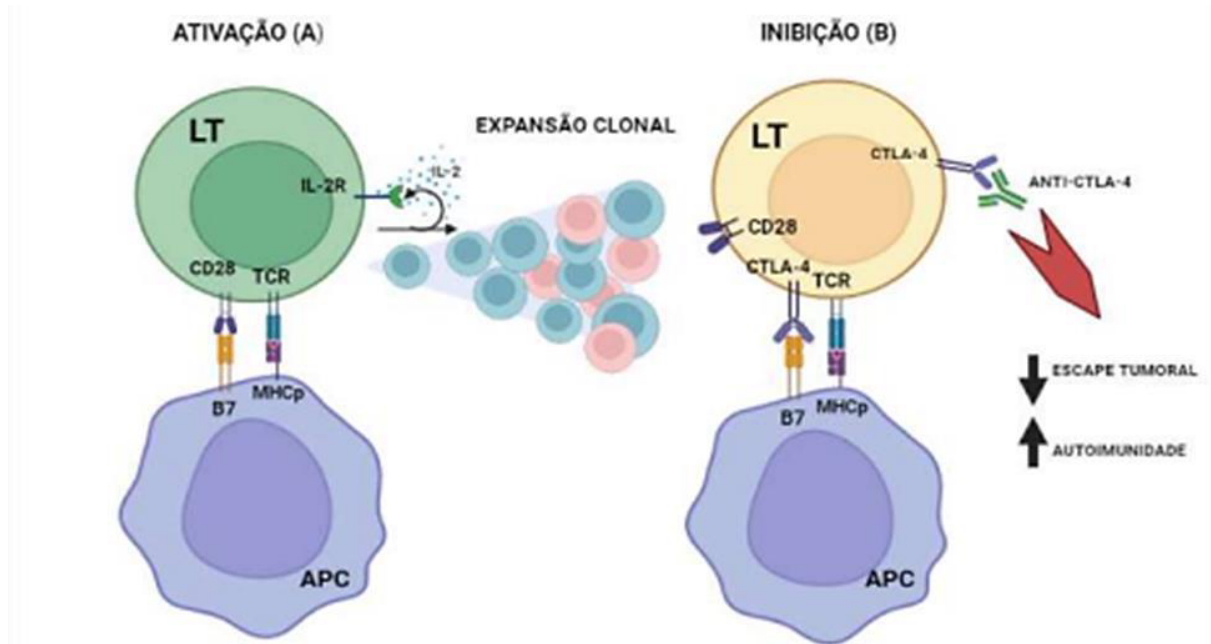
1.8 MECANISMOS DE EVASÃO IMUNE / VIAS PD-1, PD-L1 E CTLA-4 E A IMUNOTERAPIA NO LH

Em amostras de pacientes com LH as células tumorais HRS estão em um meio inflamatório e imune inativo. Isso permite com que as células HRS escape da vigilância imune e sobrevivam. Esta observação levou à sugestão de que pode ser possível reverter a imunossupressão celular no microambiente tumoral (TME) para matar células tumorais. Isso levou a pesquisas sobre terapias imunológicas direcionadas às vias do checkpoint imune, a morte celular programada 1 (PD-1) e os ligantes de morte programada (PDLs), PD-L1 (CD274, B7-H1) e PD-L2 (CD273, B7-DC) e a proteína associada ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4).

A via do checkpoint imune PD1, PD-L1 e CTLA4 forma uma rede de sinalização inibitória que regula negativamente a ativação das células T, podendo ser explorada por tumores para induzir imunossupressão, estado que permite que os tumores cresçam e se desenvolvam em vez de ser eliminado pelo sistema imunológico. Inibidores de CTLA-4 e PD-1 ou seus ligantes PD-L1, atuam para restaurar respostas imunes anti-tumorais, levando a benefícios a uma proporção substancial de pacientes tratados (Buchbinder; Desai, 2016).

A primeira via do checkpoint é o CTLA-4 que é uma molécula inibitória expressa pelas células T CD4 + e CD8 +, após ativação que ocorre com a ligação do TCR a peptídeos apresentados por células APC via MHC II e a interação da molécula co-estimuladora CD28 com seu ligante B7 (C80/C86). Isso estimula a produção de citocinas, como a IL-2, resultando na ativação e proliferação de células T. As células T ativas passam a expressar o receptor inibitório CTLA-4 na superfície da célula que é homólogo ao CD28, no qual é capaz de se ligar com maior afinidade ao B7 (CD80/CD86) resultando em sinal inibitório/supressão da resposta imune (Figura 8) (Rowshanravan et al., 2018; Sobhani, et al., 2021; Zerdas et al., 2018).

Figura 8 - Regulação da ativação dos linfócitos T pela expressão de CTLA-4.



Nota: A) A primeira etapa da ativação dos linfócitos T se observa a ligação do TCR a peptídeos apresentados por células APC via MHC e a interação da molécula co-estimuladora CD28 com seu ligante B7 (C80/C86). Isto estimula a produção de citocinas, como a IL-2, resultando na ativação e proliferação de células T. B) Células T ativas passam a expressar o receptor inibitório CTLA-4 capaz de se ligar com maior afinidade ao B7 (CD80/CD86) resultando em sinal inibitório/supressão da resposta imune. O uso de anticorpos anti-CTLA-4 pode inibir a atividade supressora do CTLA-4, potencializando a ativação das células T, que assim podem exibir maior atividade antitumoral ou favorecer o desenvolvimento de reações autoimunes.

O PD-1 é outra molécula inibitória da família do CD28, expresso em diversas células imunes tais como células B e T ativadas, monócitos e células NK. Esse interage com dois tipos de ligantes: o PD-L1 é expresso em células tumorais e outras células imunes, além de células endoteliais vasculares e o PD-L2, o qual é expresso primariamente em macrófagos e células dendríticas (Sunshine; Taube, 2015; Mullard, 2013; Chen; Han, 2015). A interação dos ligantes com a proteína PD-1 inibe diretamente a apoptose da célula do tumor (RONCADOR, 2012). A interação PD-1/PD-L1 previne a estimulação excessiva da resposta imune e colabora com tolerância ao sistema imune através da inibição da proliferação e a indução à apoptose das células T previamente ativadas pelo antígeno (Zitvogel; Kroemer, 2012; Chen; Han, 2015).

Os estudos recentes apresentam resultados indicando que a inibição do ponto de verificação representa uma abordagem muito promissora para certos tipos de malignidades hematológicas, devido à introdução de inibidores direcionados a checkpoints imunológicos, como PD-1 / PD-L1. Os níveis de expressão de PD-L1 podem prever respostas às abordagens anti-PD-1 / PD-L1 em pacientes com LH. Estudos futuros terão como finalidade delinear o valor preditivo e prognóstico da expressão de PD-L1 como biomarcador em malignidades hematológicas (Atanackovic; Luetkens, 2018).

As novas terapias biológicas são diferentes da quimioterapia convencional, apresentam um melhor perfil de eficácia e segurança, em tratamentos futuros, como o ligante (PD-L1) que pode ser expresso em uma série de diferentes tecidos tumorais. A farmacologia oncológica deve ser baseada em mecanismos moleculares específicos para um tipo de célula ou "checkpoint" e espera-se com esta abordagem, tratamentos que os pacientes apresentam melhor tolerância, com menos de efeitos adversos e sem polifarmácia excessiva (Cortez et al., 2011)

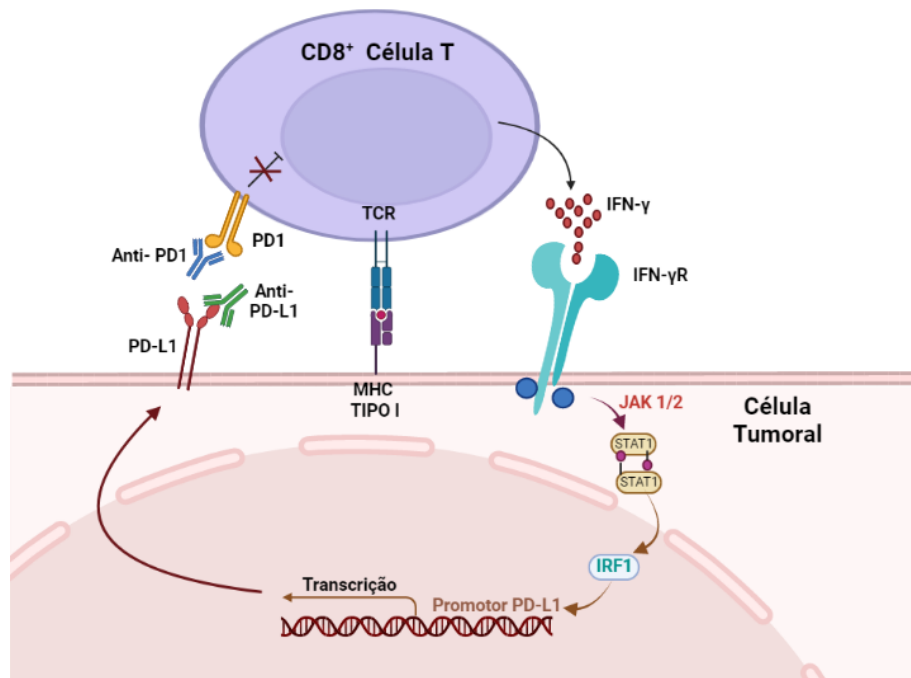
Alguns tumores malignos utilizam o eixo de sinalização PD-1 expressando PD-L1 ou ligante L2 na superfície da célula para evitar vigilância imunológica de células efetoras imunes positivas para o receptor PD-1. O direcionamento da sinalização de PD-1 com anticorpos inibidores cancelam o bloqueio da imunidade antitumoral, alcançando assim respostas clínicas robustas em certos subconjuntos de tumores sólidos, e em LHc recidivante ou refratário. Lesões cromossômicas em 9p24.1, uma região que inclui os genes CD274 (que codifica PD-L1) e PDCD1LG2 (que codifica PD-L2), podem levar a níveis elevados de ligantes PD-L1 e PD-L2, que é característico de LHc e PMBL. Isso indica perspectivas favoráveis para o direcionamento do eixo PD-1 nestes espectros de linfoma (Tanaka et al., 2018).

Atualmente, a imunoterapia oncológica tem revolucionado o tratamento dos pacientes oncológicos, em virtude do aparecimento de terapêuticas imunológicas que têm como alvo os receptores da proteína da morte programada celular programada (PD-1) e do seu ligante (PD-L1) (Teng et al., 2015). De acordo com Mullard (2013) e Flemming (2012) o organismo possui pontos de controle imune, avia do PD-1 que constituem um mecanismo de evasão do sistema imune das células tumorais e por isso, estão sendo intensamente estudados. Devido à melhor compreensão da resposta imune do tumor, a

imunoterapia apresenta-se atualmente como uma forma de tratamento.

A imunoterapia anti PD-1 bloqueia a ligação do PD-1 com o biomarcador PD-L1 (Figura 9) das células tumorais e, com isso, o sistema imune consegue identificar e combater o câncer. Os agentes bloqueadores de PD-1/PD-L1 são anticorpos monoclonais os quais se ligam ao sítio correspondente impedindo a interação de PD-1/PD-L1/PD-L2 (Zitvogel; Kroemer, 2012) Os inibidores de PD-1 e PD-L1 têm demonstrado serem clinicamente eficazes em diversos tipos de tumores, bem como no LH (Sharma; Allison, 2015).

Figura 9 - Mecanismo de bloqueio PD-1/PD-L1.



Fonte: Autoria própria.

Nota: O linfócito T (CD8+) é ativado no momento do reconhecimento do antígeno tumoral apresentado no MHC I e o IFN- γ é liberado para se ligar ao receptor do IFN- γ e, em resposta, induz a expressão de PD-L1 em células tumorais. O PD-L1 se liga ao PD-1 expresso na superfície das células T, desencadeando o efeito inibitório do eixo PD-1/PD-L1. O anticorpo anti-PD-1 ou anti-PD-L1 bloqueia a interação de PD-1 e PD-L1 e remove a inibição de células T (CD8+), aumentando assim a atividade antitumoral.

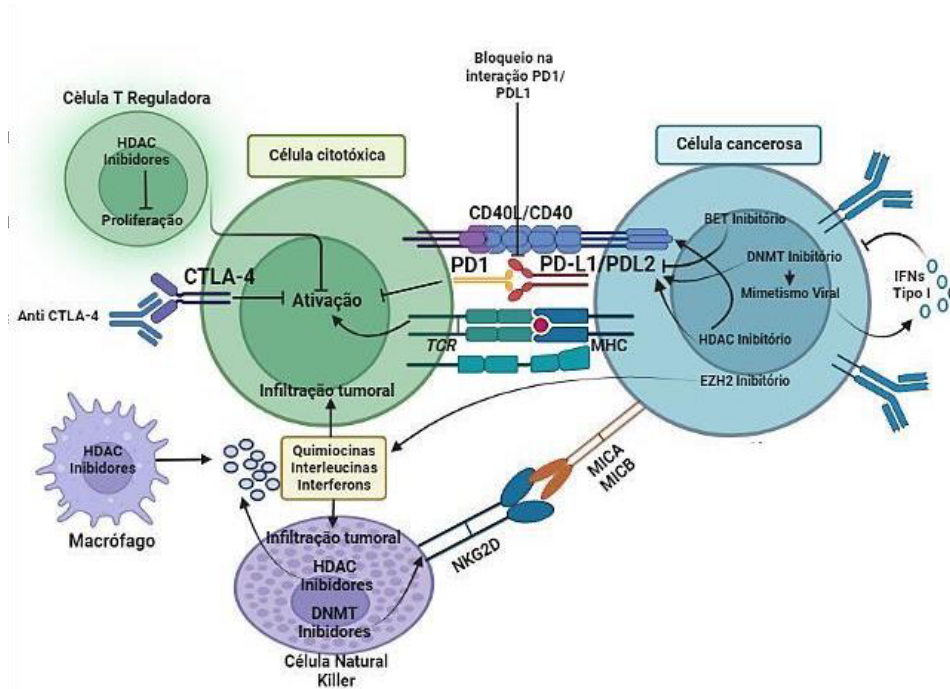
Avanços têm sido realizados nos estudos para compreensão da via de morte programada (PD-1) e do seu ligante (PD-L1) e o tratamento com os anticorpos monoclonais (mAbs), que são utilizados para bloquear a via da DP-1 no tratamento de cânceres (terapia anti-PD), como exemplo no LH refratário/recidivante clássica (Chen; Han, 2015).

A proteína PD-1 pode ser encontrada em uma alta porcentagem de linfomas,

principalmente no LHCRL, sugerindo uma estreita relação biológica (Roncador, 2012). A PD-1 pode ter significância sobre o prognóstico do paciente. Isso pode estar relacionado à imunossupressão onde o PD-L1 é altamente expresso, que pode se relacionar com um microambiente ativado e não supressivo (GREAVES et al., 2013). Diversos estudos sobre os biomarcadores estão sendo realizados para identificar pacientes que se beneficiam das terapias de bloqueio do PD-1 (Gatalica et al., 2015)

Inibidores epigenéticos também desempenham um papel importante na imunooncologia. Três classes de inibidores epigenéticos estão atualmente em ensaios clínicos, em combinação com um bloqueio de proteína PD-1 - interação de PDL-1 ou bloqueio de antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4) (Figura 10) (Pfister; Ashworth, 2017).

Figura 10 - Interação de (PD1/PD-L1) ou bloqueio de antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA4).



Fonte: Autoria própria

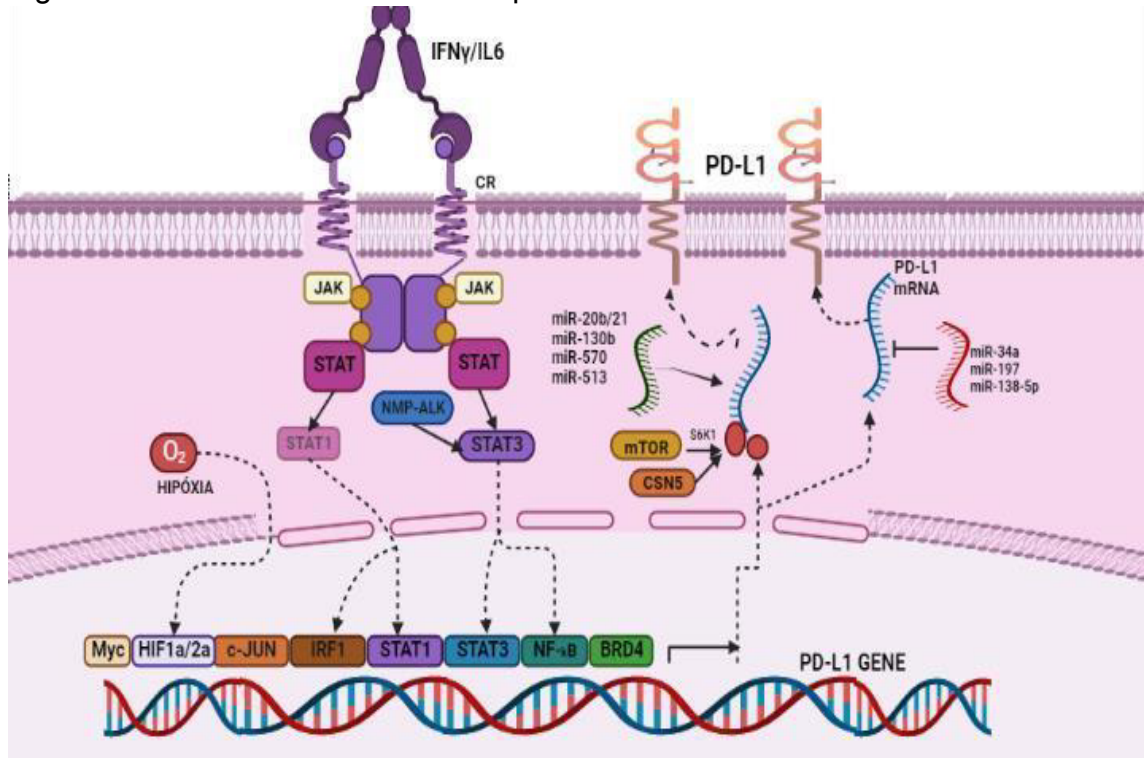
Nota: Devido às suas funções na regulação da transcrição, os inibidores da DNA metiltransferase (DNMT) e inibidores da histona desacetilase (HDAC) regulam positivamente a expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) apresentando antígeno, antígenos tumorais e T auxiliar 1 (T_H1) - tipo quimiocinas CXC-motif ligante 9 de quimiocina (CXCL9) e CXCL10. Os inibidores de EZH2 também regulam positivamente a expressão de quimiocinas do tipo T_H1, que promovem a infiltração tumoral de CD8 citotóxico* Células T e células natural killer (NK), resultando em regressão tumoral dependente de células imunes. Além disso, os inibidores DNMT aumentam os níveis de RNA de fita dupla (dsRNA) em células cancerosas, criando um 'mimetismo viral' e induzindo uma resposta do interferon tipo I (IFN). Os

inibidores DNMT e HDAC regulam positivamente os níveis de PD-L1 nas células cancerosas, enquanto os inibidores de bromodomínio e extra-terminal (BET) regulam negativamente os níveis de PD-L1. Além disso, os inibidores de HDAC regulam positivamente a expressão de MICA (sequência A relacionada ao polipeptídeo de classe I do MHC) e MICB, os ligantes do receptor de ativação nas células NK (NKG2D), e promovem a eliminação do tumor pelas células NK.

A expressão de pontos de verificação imunes inibitórios como PD-1 / PD-L1 funcionam como mediadores do ponto de equilíbrio e escape imune tumoral. O uso de anticorpos monoclonais (mAbs) bloqueiam estes inibidores e apresentam uma nova estratégia de agentes imunoterápicos para tratamento do câncer (Topalia et al., 2015).

Um dos mecanismos pelos quais a sinalização de hipóxia prejudica a funcionalidade das células T é a indução de PD-L1 em células supressoras derivadas de mielóide em condições de hipóxia. Na verdade, o HIF-1a regula transcricionalmente a expressão de PD-L1 pela ligação ao HRE de seu promotor. Além disso, PD-L1 pode ser um alvo de HIF2a em células de carcinoma de células renais de células claras (ccRCC) nas quais o supressor de tumor pVHL foi anulado. Após a deficiência de pVHL, níveis aumentados de PD-L1, associados à ativação de HIF-2a, foram observados *in vitro*. Resultados semelhantes foram obtidos a partir de amostras de pacientes com ccRCC com mutações de perda de função de VHL, onde uma correlação positiva foi observada entre a expressão de PD-L1, expressão de HIF-2a e mutações de VHL (Figura 11) (Zerdes et al., 2018).

Figura 11 - Controle transcricional e pós-transcricional de PD-L1 no câncer.



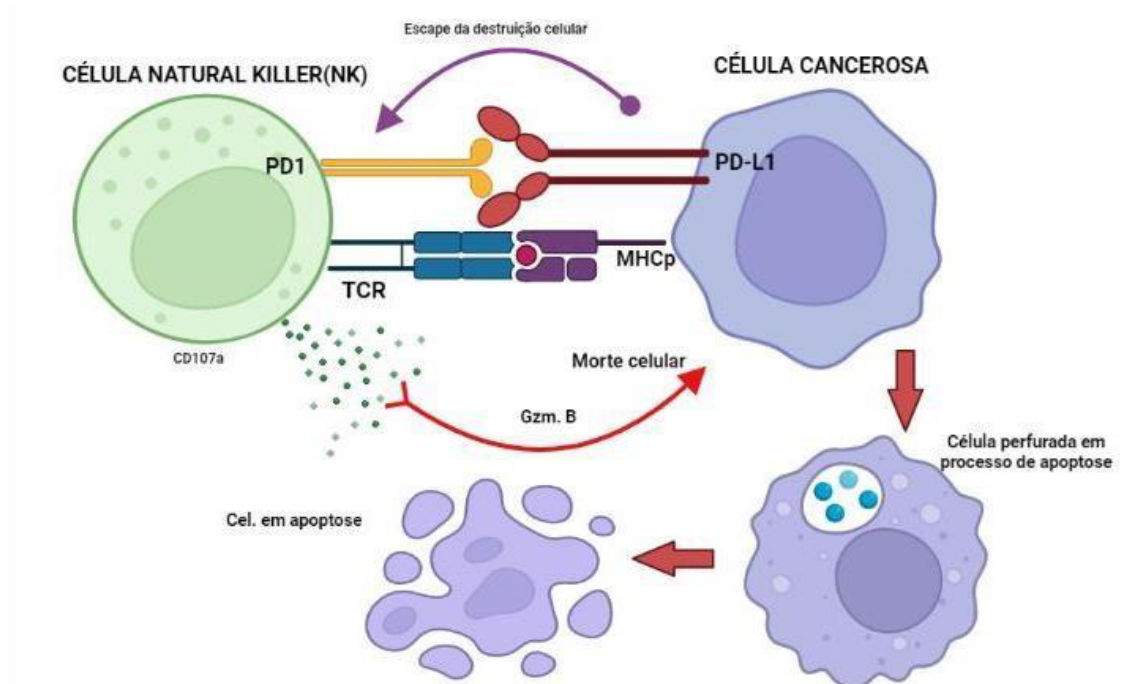
Fonte: Autoria própria

Nota: A regulação de PD-L1 é complexa e ocorre em diferentes níveis. Várias vias de sinalização estão envolvidas, incluindo RAS / RAF / MEK / MAPK-ERK e PI3K / PTEN / Akt / mTOR. Sua ativação por mutações oncogênicas e / ou de perda de função pode levar à ação direta sobre genes-alvo ou à ativação de fatores de transcrição. Moléculas como STAT3, STAT1, c-Jun, HIFs ou NF-κB podem se deslocar para o interior do núcleo, ligar-se a locais específicos no promotor do gene PD-L1 e induzir sua expressão. PD-L1 também é regulado pós-transcionalmente por microRNAs, que se ligam ao mRNA e levam à sua repressão ou aumento da tradução.

1.8.1 Natural Killer (NK)

As Células Natural killer (NK) podem matar rapidamente várias células adjacentes se exibirem marcadores de superfície associados à transformação oncogênica. Essa propriedade, que é única entre as células imunes, e sua capacidade de aumentar as respostas de anticorpos e células T apoia o papel das células NK como agentes anti-câncer. Embora os tumores possam desenvolver vários mecanismos para resistir ao ataque das células NK endógenas, a ativação *ex vivo*, a expansão e a modificação genética das células NK podem aumentar muito sua atividade antitumoral e equipá-las para superar a resistência (Figura 12) (Shimasaki et al., 2020). As NK são o protótipo das células linfóides inatas dotadas de uma poderosa função citolítica que fornecem defesa ao hospedeiro contra infecções microbianas e tumores (Morvan & Lanier, 2016).

Figura 12 - Esquema do eixo PD-L1/PD-1 na citotoxicidade de células natural killer (NK).



Nota: Esquema do eixo PD-L1/PD-1 na citotoxicidade de células natural killer (NK) em células de osteossarcoma humano por secreção de Gzm B. As células NK matam células de osteossarcoma humano sem grandes moléculas de histocompatibilidade exercendo funções citolíticas, principalmente secretando Gzm B e expressando CD107a; no entanto, certas linhagens celulares de osteossarcoma humano ou pacientes com osteossarcoma que superexpressam moléculas PD-L1 demonstram uma interação entre PD-L1 e PD-1 em células NK, de modo que as células podem escapar da vigilância imunológica. GzmB, granzima B; células NK, células natural killer; PD-1, proteína de morte celular programada 1; PD-L1, ligante de morte celular programada 1.

Ao contrário das células T, as células NK são linfócitos imunes inatos, que matam ou lisam células malignas ao produzir citocinas e quimiocinas, independentemente da apresentação do antígeno (Zhang et al., 2019)

O PD-1, um receptor para PD-L1, é expresso em células imunes, incluindo células NK, e interage com células tumorais, levando à apoptose, tolerância celular. Como componentes principais do sistema imunológico inato, as células NK podem destruir células tumorais ou células infectadas diretamente, a lise específica de células NK em células humanas é aumentada quando o anticorpo PD-L1 bloqueia PD-L1 / PD-1. O sucesso clínico das imunoterapias contra o câncer direcionadas aos receptores do ponto

de verificação imune das células T PD-1 / PD-L1 demonstrou a importância da imunoevasão como uma marca registrada do câncer (Zhang et al., 2019; Ely et al., 2012).

Esforços extensivos estão fornecendo evidências de que as células NK positivas para CD16 podem induzir citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) com números abundantes no sangue periférico(90%) e no baço (Valipour et al., 2019).

1.9 DOENÇA RECIDIVANTE OU REFRATÁRIA E QUIMIOTERAPIA DE RESGATE E IMUNOTERAPIA

A recidiva é definida, para os pacientes em remissão completa, como o aparecimento de novas massas tumorais diagnosticadas por métodos clínicos, radiológicos e histológicos, após quatro semanas do término do tratamento inicial (Pracchia et al., 2005). A maioria dos pacientes com LH é curada com terapia de primeira linha. Os principais desafios são reduzir os efeitos tóxicos do tratamento, mantendo resultados excelentes, e melhorar a sobrevida de pacientes com doença de baixo risco, refratária ou recidivante. A perspectiva dos pacientes com doença recidivante depende do tempo para a recaída, do estágio no momento da recaída e do status de desempenho. Pacientes com doença refratária - incluindo aqueles que recaíram menos de 3 meses após o término do tratamento - têm resultados significativamente piores do que aqueles que recaíram tendo estado em remissão anteriormente (Townsend;Linch, 2012).

Aproximadamente dois terços dos pacientes com LH terão uma massa residual observada com exames de imagem padrão no final do tratamento. A principal modalidade de imagem para acompanhamento pós-tratamento é a TC, mas essas varreduras não são capazes de diferenciar com precisão entre uma massa fibrótica benigna e um tumor residual. (Meyer et al., 2004).

Para avaliação pós-tratamento, especialmente se uma massa residual estiver presente, a PET se tornou um procedimento padrão na prática clínica da rotina e substituiu a cintilografia com gálio como adjuvante da TC. Existem dados promissores para o papel preditivo do FDG-PET (Meyer et al., 2004). Em cerca de 20% dos pacientes com LH, segundo seu grupo de risco e o conceito de tratamento inicial, desacelerou uma progressão primária ou uma doença recorrente. Recomendamos realizar um PET/TC para avaliar a resposta ao tratamento e ao perfil de risco. Os pacientes com recorrências de

alto risco devem receber quimioterapia de consolidação (doses altas e/ou brentuximab) e radioterapia de consolidação. Em pacientes com LH recorrente, não se recomendou tratamento com transplante alogênico mieloablativo de células tronco devido à alta mortalidade associada ao tratamento. O alotransplante de células tronco depois de um condicionamento de dose reduzida (não mieloablativo) pode ser realizado em casos individuais para tratar as recorrências. Se há uma suspeita de recorrência, se recomenda confirmar ou descartá-la mediante imagens radiológicas adequadas seguidas de uma biópsia (consenso de especialistas) (Bröckelmann et al., 2018).

1.9.1 Fatores prognósticos quanto à sobrevida e fatores prognósticos quanto a sobrevida livre de doença

O LH é um dos cânceres mais curáveis, com taxas de sobrevida de 1 ano, de 5 anos e de 10 anos de ao redor 90%, de 85% e de 80%, respectivamente (MANDAL, 2019). Diversos fatores são tomados em consideração ao determinar o prognóstico para um paciente com LH. Alguns destes incluem: idade, saúde geral e capacidade suportar a quimioterapia e os efeitos secundários potenciais, subtipo de LH, fase do câncer como agressivo. Os estudos mostraram que um resultado pior pode ser previsto na presença dos seguintes fatores: gênero masculino, idade em um diagnóstico de 45 anos ou mais velho, subtipo de celularidade mista, subtipo de depleção de linfocitária, doença da fase IV, contagem de linfócitos de menos de 8%, nível de hemoglobina abaixo de 10,5 g/dL, nível de albumina abaixo de 4,0 g/dL, contagem de glóbulos brancos de 15,000/ μ l ou mais, uma taxa alta de sedimentação, grande número de grupos de linfonodos. A sobrevida depende geralmente da fase em que o câncer é diagnosticado e o tratamento é iniciado (Mandal, 2019.).

2 RELEVÂNCIA

O LHc é um câncer do sistema imunológico. A combinação de quimioterapia e radioterapia resulta em alta taxa de cura, no entanto, até um quarto dos pacientes com LHc em estágio avançado podem recidivar. Um mecanismo de recaída é através da evasão imunológica; LHc pode evitar a destruição imune manipulando a proteína reguladora de células T morte celular programada-1 (PD-1) e a interação de ligantes de morte celular programada-1 (PD-L1) e 2 (PD-L2). Os inibidores do checkpoint imunológico (CPIs), como o pembrolizumab, são eficazes na LHc recidivante/refratária (R/R) (Al Hadidi; Lee, 2020).

O PD-L1 e PD-L2 são superexpressos na superfície da célula tumoral no LHc, e são, portanto, alvos terapêuticos atraentes para esta doença. Dois anticorpos anti-PD-1 estão atualmente aprovados no LHc, pembrolizumab e nivolumab, e ambos foram encontrados para fornecer eficácia a longo prazo em pacientes com recaída ou refratária do LHc. Pembrolizumab é um anticorpo monoclonal direcionado a PD-1 aprovado pela ANVISA (2018) para tratamento do LHc refratário e em pacientes que apresentam recidiva da doença após três ou mais linhas de terapia (incluindo brentuximab vedotina em países da UE e Reino Unido). A aprovação foi baseada em resultados para a resposta do tumor e durabilidade da resposta do estudo de fase 2 KEYNOTE-087 (NCT02453594). Esse estudo mostrou atividade antitumoral e durabilidade respostas no LHc recidivante ou refratário, com respostas objetivas observadas em 72% dos pacientes e uma sobrevida livre de progressão mediana de 13,7 meses após 27,6 meses de seguimento. Eventos adversos relacionados ao tratamento mais frequentes foram hipotireoidismo, fadiga, pirexia e erupção cutânea (Kuruvilla et al. 2021).

3 JUSTIFICATIVA

Na última década, uma compreensão da regulação das respostas das células T levou ao desenvolvimento inovador e ganhador do Prêmio Nobel, do bloqueio do ponto de verificação imunológico (IC) que revolucionou o entendimento de novas vias de sinalização e de tratamentos do câncer (Wei et al., 2018).

Os avanços recentes no entendimento do funcionamento do microambiente tumoral e do funcionamento do sistema imunológico foram essenciais para o surgimento de novas opções terapêuticas, baseadas na modulação da resposta imune antitumoral, como os reguladores de checkpoints imunológicos (anti-CTLA 4, anti- PD-1, PD-L1/L2 e CTLA-4) focando em pacientes refratários em outras terapias. Torna-se também necessário o desenvolvimento de métodos preditores de resposta a estes novos tratamentos. Sendo assim, a expressão tumoral de PD-1, PD-L1, PD-L2 e CTLA-4 pode emergir como um potencial biomarcador. Dessa forma, o estudo procura avaliar a presença desses marcadores imuno-histoquímicos e correlacioná-los com os dados clínicos e com o tipo de resposta imune/inflamatória (Tavares et al., 2018).

A Imunoterapia, com o uso dos inibidores de checkpoint, re-ativam o sistema imunológico ou também bloqueiam a progressão da disseminação de células cancerígenas no paciente para combater linfo-neoplasias e anticorpos biespecíficos, que aproximam as células de células de defesa umas das outras (Clara et al., 2020).

Uma melhor compreensão das vias e a interação entre as CSCs e o sistema imunológico do tumor pode ser a chave para abrir uma nova era de tratamentos de câncer associados a uma menor propensão para desenvolver resistência e com melhor atividade anti-metastática, resultando em melhores resultados para os pacientes (Clara et al., 2020).

As células-tronco cancerosas (CSCs) também apresentam grande heterogeneidade com a conseqüente falta de marcadores específicos de CSCs que apresentam um grande desafio para o direcionamento (Dzobo et al., 2020). A Desregulação epigenética no câncer como que contém um espectro de expressões encontradas no câncer foi elucidado nos últimos anos por meio da imunohistoquímica e PCR em tempo real de próxima geração, é evidente que essas expressões e mutações genéticas, amplificações, deleções e rearranjos que afetam as vias regulatórias epigenéticas ocorrem com frequência no câncer (Bennett; Licht, 2018).

A importância da investigação se deve a identificação das vias de escape do tumor ou medidas para identificar quais das proteínas que são expressas estão em maior proporção e analisar se isso está ou não relacionado à sobrevida ou outros sintomas clínicos que ocorrem individualmente a fim de ter potencial eficácia terapêutica, melhorando com estes estudos as investigações sobre a sobrevida do paciente livre de eventos não desejados em relação ao uso da imunoterapia no LH.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da proteína PD-1, PDL-1 e CTLA-4 em pacientes com Linfoma de Hodgkin Clássico associando-os aos marcadores sócio-demográficos, clinicose com o tratamento.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar a expressão do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 nos pacientes com Linfoma de Hodgkin.
- Correlacionar a associação da expressão do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com as variáveis do perfil sociodemográfico dos pacientes com Linfoma de Hodgkin.
- Avaliar a associação da expressão do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com as variáveis clínicas (;subtipos histológicos do LH; pontuação prognóstica (IPS) nos pacientes com linfoma de Hodgkin.
- Verificar a associação da expressão com os tratamentos (farmacológico ABVD e com o transplante de células tronco hematopoiético)
- Avaliar a associação da expressão das proteínas do PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com a sobrevida global e livre de eventos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo de natureza quantitativa e corte retrospectivo dos pacientes com diagnóstico histopatológico de LHc entre os anos 2015 a 2019, em acompanhamento ambulatorial no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza, Ceará.

5.2 CASUÍSTICA

- Para este estudo, foram selecionados um total de 52 pacientes com LH, e duas amostras de linfonodos sem critérios de diagnóstico de LH, maiores de 18 anos. Os dados foram coletados de prontuários no período de 2018 e 2019
- As amostras de biópsia de linfonodo dos pacientes com LH estavam armazenadas no banco de blocos departamento da Patologia da Universidade Federal do Ceará no período 2015 a 2019, seu uso foi autorizado pelos pacientes após ciência e assinatura do TCLE.
- O estudo imunohistoquímico com os marcadores de checkpoints foi realizado em parceria com o departamento da Morfologia da UFC (Figura 12).

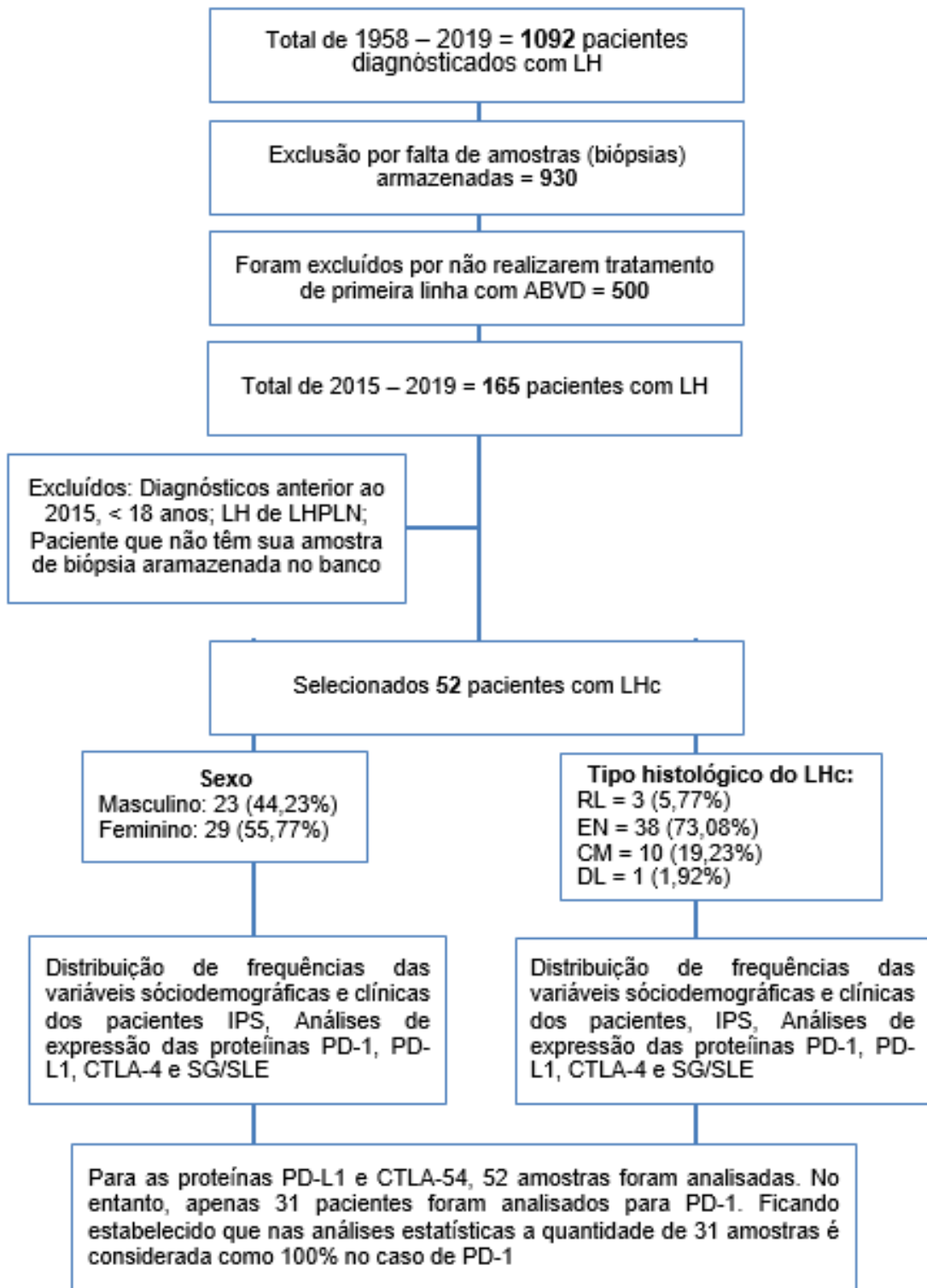
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com tratamento oncológico realizado no HUWC.
- Pacientes adultos, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a 18 anos.
- Pacientes diagnosticados no período de 2015 a 2019 com amostra armazenada e disponível no banco de blocos no departamento de patologia da Universidade Federal do Ceará - UFC.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Linfoma de Hodgkin predominância linfocitária nodular (LHPLN).
- Dados incompletos no prontuário.
- Blocos e amostra danificados ou insuficientes.
- Pacientes que não têm sua amostra de biópsia armazenada no banco da departamento de patologia da UFC.

Figura 13 - Fluxograma de coleta de dados.

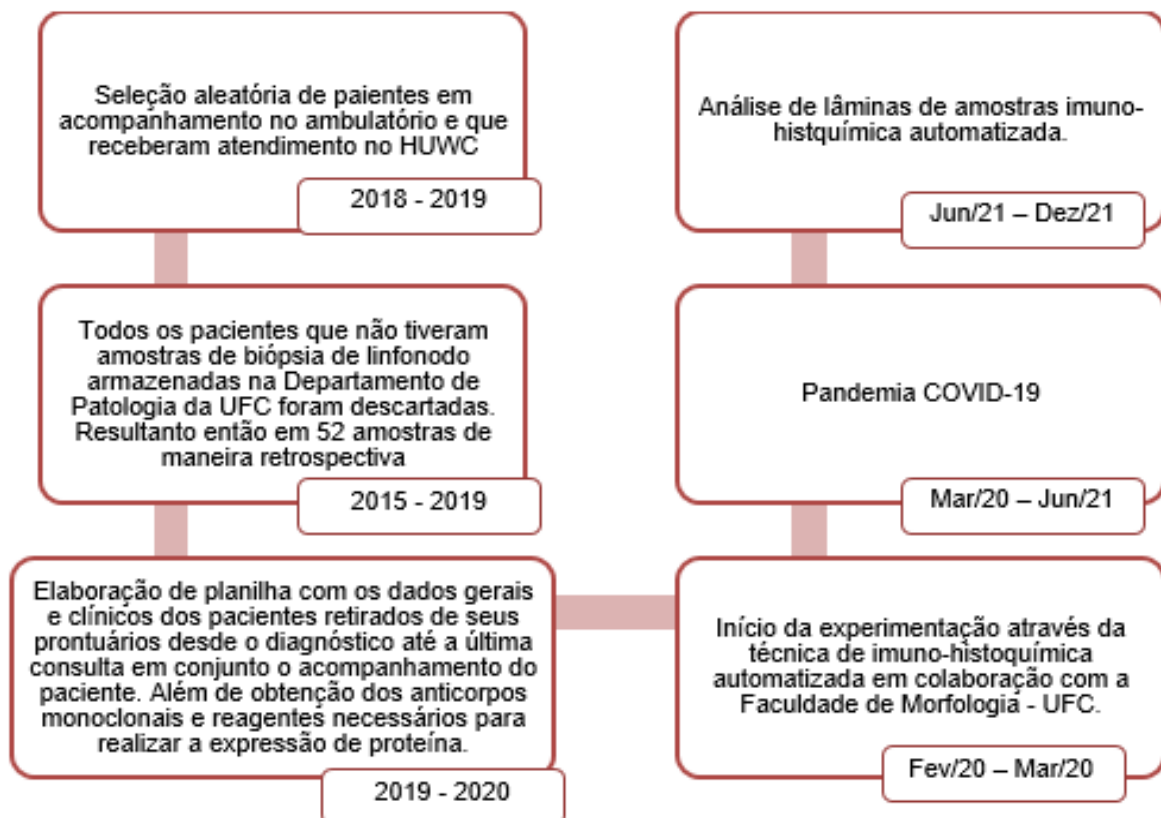


Fonte: Autoria própria

5.5 COLETA DE DADOS

- No presente estudo, a coleta de dados foi realizada através de revisão de prontuários de pacientes armazenados no HUWC. A partir de uma planilha de 1.092 pacientes diagnosticados com LH, se pesquisou no banco de amostras disponíveis no departamento da patologia, e os que atendiam aos critérios, chegando a um total de 52 pacientes. As variáveis estudadas foram compostas pelas características da população e por informações clínicas do paciente no período, o período de revisão de prontuários foi 2018 a 2019 com amostras (biópsias) armazenadas no período de 2015 a 2019.
- Foram coletados dados que abordavam: características sociodemográficas e clínicas dos pacientes (sexo, idade) e da doença (sintomas B, local do primeiro gânglio), data do diagnóstico, tipo histopatológico e análises quantitativas de lâminas com seções de linfonodos por meio de imuno-histoquímica.

Figura 14 - Fluxograma Geral com os tempos da seleção de pacientes ao análises de lâminas de Imuno-histoquímicas.

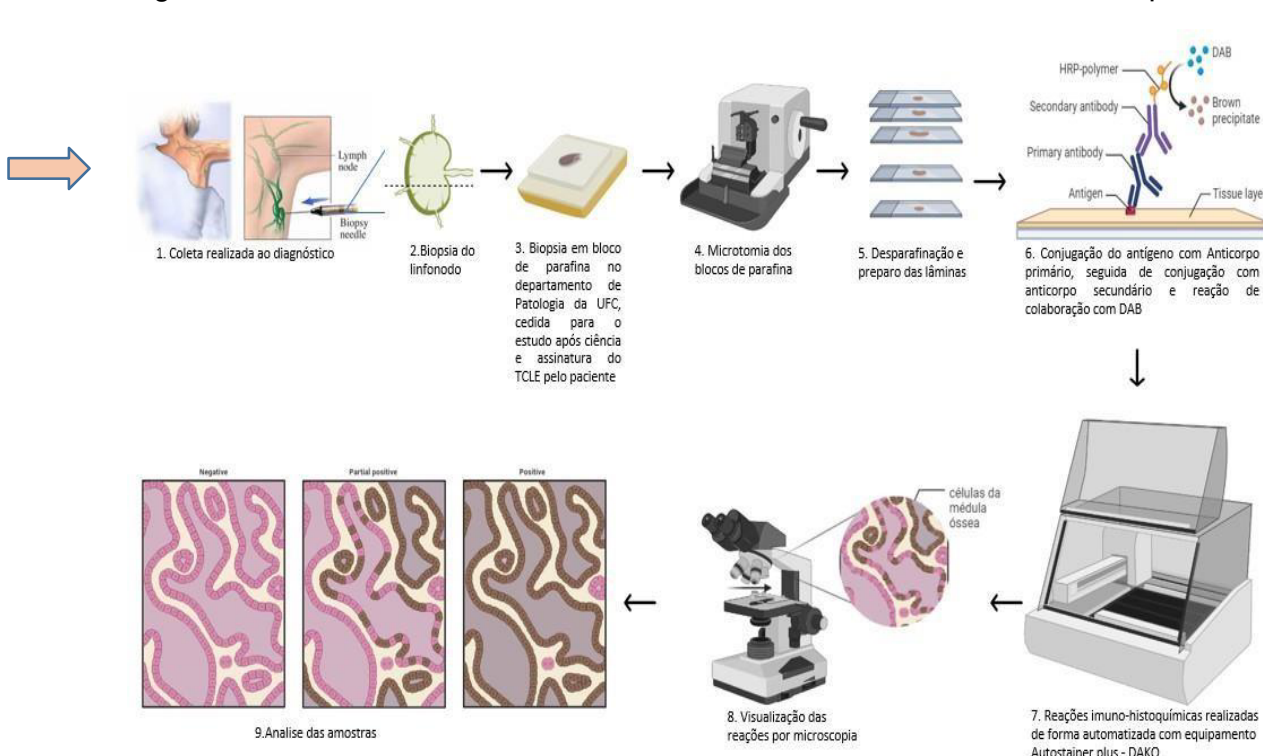


Fonte: Autoria própria

5.6 ANÁLISES DA IMUNO-HISTOQUIMICA

Como controles positivo dos testes dos anticorpos das proteínas PD-1, PD-L1 E CTLA-4 foi usado tecido de amígdala com positividade reconhecida para as proteínas, fornecido pelo laboratório de Morfologia da UFC e como controle negativo foi utilizado linfonodos sem malignidade de pacientes sem criterios de diagnostico do LH.

Figura 15 - Procedimento desde a coleta da amostra até a análise das expressões.



Fonte: Autoria própria

52 amostras foram utilizadas para as análises das proteínas PD-L1 e CTLA-4, porém, na análise de PD-1, apenas 31 pacientes foram analisados devido à diluição do anticorpo disponível.

5.7 ANÁLISES DA IMUNOHISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS PD-1, PD-L1 E CTLA-4

A técnica de imunohistoquímica foi realizada no departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará de forma automatizada com o equipamento Autostainer Plus (DAKO®). Para a análise da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foram utilizadas biópsias de linfonodo em bloco de parafina de cada paciente diagnosticado com LH e como controle positivo foi utilizado tecido de amígdala e para controle negativo foi utilizado um tecido de linfonodo de paciente sem critérios de diagnóstico para LH, ou seja, sem o diagnóstico de LH.

As biópsias foram cortadas por microtomia no departamento de Patologia. Foram confeccionados cortes em triplicata com espessura de 4 μm para a realização da imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinados com inserção em estufa (70°C) e três ciclos de imersão em xilol por 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram re-hidratados em álcool absoluto. Os cortes histológicos foram então lavados com água destilada por 10 minutos e realizados a recuperação antigênica utilizando o PT Link (Dako); com 99° por 20min; os tampões de recuperação antigênica EnVision Flex Target Retrieval Solution High pH - K8000 são 50x diluíveis serve para que o tecido fique livre de formol para poder receber esse ligar ao anticorpo primário.

Em seguida, os cortes foram lavados com solução de lavagem tris Buffered Saline Plus tween 20 (pH=7,4) por 5 minutos em temperatura ambiente. Dando continuidade ao protocolo, realizou-se o bloqueio enzimático com kit peroxidase block for image Analysis por 5 minutos e em seguida aos cortes foram adicionado o (Supre Block 8ml) por 5 minutos, que reforça ainda mais o bloqueio enzimático e a cada etapa uma lavagem com a solução tris buffered for realizada por 4 minutos.

Os cortes foram incubados "overnight" (4°C) com o anticorpo primário anti- PD-1 (Scy-Tek®), anti-PD-L1 e anti-CTLA-4 (ABclonal®) e por 20 minutos diluído em 1:800, 1:1000 e 1:1000, respectivamente, em Antibody Diluent Tris, Green. Após a lavagem com PBS, adicionou-se o CRF TM Anti-Polyvalent HRP por 20 minutos para melhorar a visualização da ligação do anticorpo primário com o antígeno. Após nova lavagem, seguiu-se a revelação por meio da coloração com o cromógeno DAB (Scy-Tek®, uma gota de DAB para um mL de diluente), seguida por contra-coloração com hematoxilina de Gil (DAKO®) por 10 minutos. O DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Por fim, realizou-se a desidratação dos cortes e montagem das lâminas com entelan.

5.8 INTERPRETAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PD-1, PD-L1 E CTLA-4

A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 apresentam perfil de marcação de membrana e citoplasmática, no qual o anticorpo anti-PD-1 marca a membrana das células T e células B, o anti-PD-L1 marca as membranas das células Reed Sternberg e de células em proliferação, já o anti-CTLA-4 marca a membrana das células T.

A expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi revisada e pontuada de

forma independente por dois analistas. Casos discrepantes foram re-analisados até que um consenso fosse alcançado. O Tecido da amígdala com positividade conhecida para PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi usado como controle positivo. O tecido de linfonodo de paciente sem cri foi utilizado como controle negativo.

Foi elaborado um escore de positividade (EP) e de intensidade da coloração (IC) das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi classificado de forma semiquantitativa de acordo. O escore imunorreativo modificado (IRS), e a intensidade de coloração foram classificados semiquantitativamente. O EP variou de 0 a 12 e foi a multiplicação da pontuação de proporção celular positiva (0–4) e pontuação de intensidade de coloração (0–3) (material complementar, Figura 14) Lee (2021). Seguindo as recomendações metodológicas da observação de análise quantitativa e observacional na seleção de amostras para incluir ou descartar e as leituras das lâminas e bases para iniciar a análise mas o estudo Dix et al. (2016), Tavares (2018) e Webb (2016).

A análise de marcação por intensidade foi considerada em porcentagem, foi realizada a varredura total da lâmina, foram observados em cinco campos, contando até 100 células, considerando negativa a ausência total de linfócitos marcados, os resultados foram apoiados por um patologista (Dario Rocha F.) que verificou a positividade dos reagentes e determinou as diluições corretas dos anticorpos, um médico hematologista (Fernando Barroso D.) que verificou a positividade dos marcadores de linfócitos nas lâminas de imunohistoquímica e um biomédico (Yhasmine D. Oliveira) que apoiou a contagem em percentual de células e a intensidade.

Figura 15 - Figura 16 - Pontuação da Imunorreação.

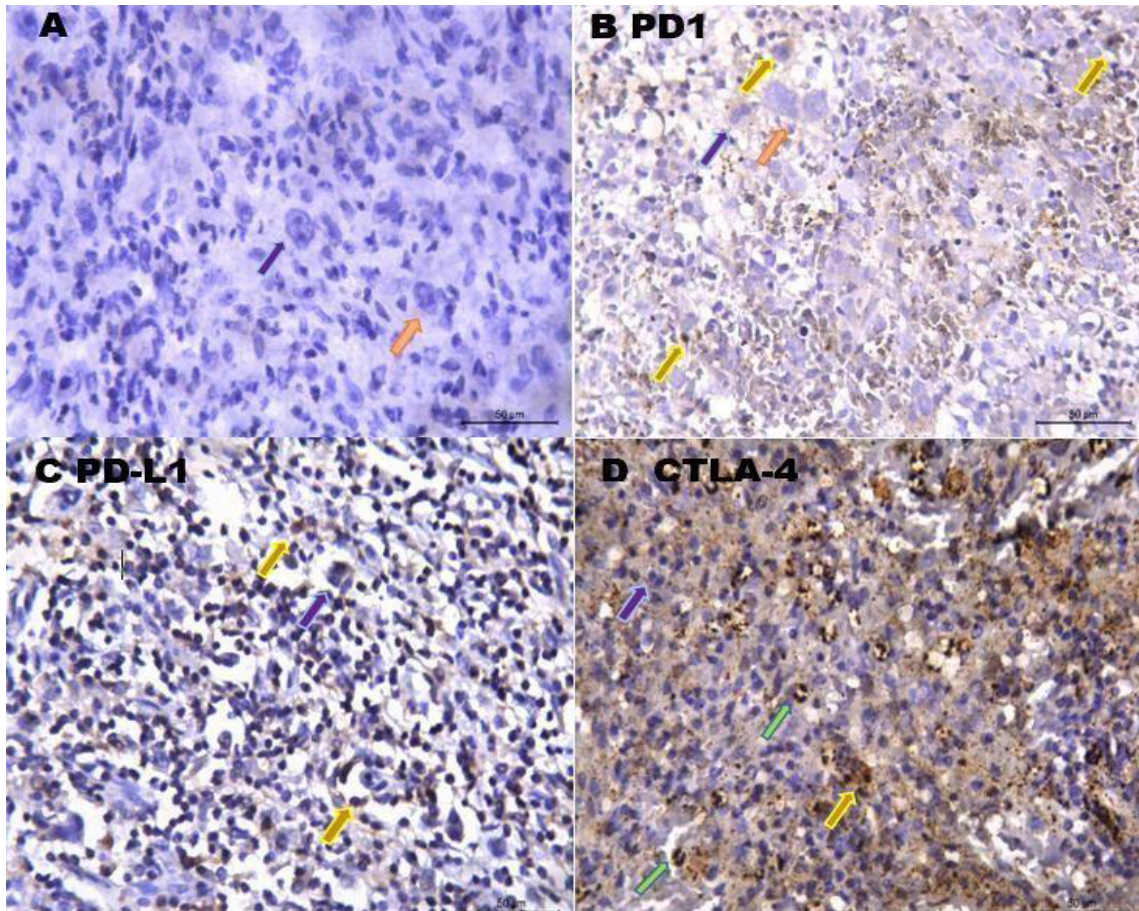
A (Porcentagem de células positivas)	B (Intensidade de coloração)	Pontuação (AxB)
0= Sem células positivas	0= Sem coloração	0= Negativo
1= 0-1% células positivas	1= Reação leve	1= Positivo fraco
2= 2-50% células positivas	2= Reação moderada	≥2= Positivo
3= 51-80% células positivas	3= Reação intensa	
4= > 80% células positivas		

Fonte: Lee et al., 2021

Os casos representativos de várias intensidades de coloração são ilustrados na (Figura 16). Outras células mononucleares, essas células são acompanhadas por um corte deficiente de células inflamatórias não neoplásicas, incluindo linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, histiócitos e plasmócitos, no linfonodo coraram de forma variável, mas não

foram analisadas neste estudo devido à marcada heterogeneidade.

Figura 17 - Marcação da expressão PD-1, PD-L1 e CTLA-4 em LHc.



Fonte: Autoria própria

Nota: Características histológicas e imuno-histoquímicas do LHc: (A) Células neoplásicas binucleadas chamadas "células de Reed-Sternberg". Células neoplásicas com um espaço lacunar ao redor do citoplasma, chamadas de "células lacunares". lâmina corada com hematoxilina; (B) Célula (linfócito) com marcação membranal e citoplasmática que expressa a presença de receptores PD-1, Célula neoplásica células de Reed-Sternberg, Células lacunares em forma de "pipoca"; (C) Célula Reed-Sternberg, Linfócito com com marcação membranal e citoplasmática que expressa a presença de receptores PD-L1; (D) Linfócito com com marcação membranal e citoplasmática que expressa a presença de receptores CTLA-4, Célula Reed-Sternberg, Considerado marcação inespecífica os neutrófilos, eosinófilos e outras células que não são de interesse neste estudo mas que fazem parte e exibem um fundo de células altamente inflamatórias, incluindo pequenos linfócitos e outras células não neoplásicas. (objetiva 40x)

5.9 ESPECIFICAÇÕES DOS ANTICORPOS FORNECIDOS PELA BULA

5.9.1 PD-1

Nome: PDCD1 / PD-1 / CD279 (MORTE CÉLULA PROGRAMADA 1); CLONE NAT105

Descrição: Espécie: rato; imunógeno: célula TY (células T / NK de Humman Leukimia); Clone: NAT105; Isotipo: IgG1, Kappa; ID do gene Entrez: 5133 (Humman);

Loc. Cromossomo Hu: 2q37.3 (Roncador *et al.*, 2007).

5.9.2 PD-L1

Nome: PD-L1 / PDCD1LG1 / CD274 / B7-H1; CLONE PD-L1 / 2746 (CONCETRADO)

Descrição: espécie: rato; imunogênico: fragmento recombinante da proteína CD274 humana (em torno de aa 39-1919. A sequência exata é proprietária.; Clone: PD-L1 / 2746; Isotipo: IgG2b, Kappa; Entre Gene ID: 29126 (Human); Hu Chromosome loc.: 9p24. 1;

Controle positivo: coração, placenta, baço e tecido. Células lisadas. RAW, HEK293 ou HepG2. Célula Jurkat; Localização celular: superfície celular e citoplasma.

5.9.3 CTLA-4

Nome: Anticorpo policlonal CTLA-4 / P16410 / proteína citotóxica de linfócito T4
Imunogênio: 49-223 de CTLA-4 humano; ID do gene: 1493; Fonte: Coelho; Isotipo: IgG; reatividade cruzada: humanos, camundongos e ratos. (Duncan *et al.*, 2016; Seigel *et al.*, 2016).

5.10 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram compilados no Microsoft Excel versão 2016 e analisados utilizando o programa R versão 4.0.3. As variáveis epidemiológicas e clínicas quando contínuas foram apresentadas como mediana, valores mínimos e máximo e quando variáveis categóricas, por frequências e porcentagens..

O teste de independência qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram realizados para estabelecer a associação entre os possíveis preditores de mortalidade e de recidiva. Foi analisado a associação entre as variáveis sexo, idade, estadiamento clínico sintomas A/B, subtipo histológico, comprometimento extralinfonodal, tratamento e tempo até o diagnóstico com desfecho óbito e desfecho através da análise univariada. Posteriormente, uma análise multivariada foi realizada dos preditores que apresentaram associação significativa através da regressão logística binária. O intervalo de confiança de 95% (IC95%) foi considerado para todos os métodos estatísticos com nível de significância estatística de $p < 0,05$.

A sobrevida global (SG) foi considerada o tempo da data do diagnóstico até o óbito ou a data da última consulta com follow up em meses. A sobrevida livre de eventos (SLE) foi calculada a partir da data do diagnóstico até a primeira resposta do paciente

(considerado evento). A curva de sobrevida foi determinada usando o método Kaplan-Meier e o teste Log-Rank Mantel-Cox para as análises de associações com a sobrevida. Foi calculado a taxa mediana da sobrevida global e livre de eventos como o follow up em meses.

5.11 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa contou com aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa da UFC, com CAAE: 95289418.0.0000.5054 e número do parecer: 2.989.167, amparada nos critérios da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os dados foram mantidos em sigilo, todas as informações contidas nos formulários foram arquivadas sob a responsabilidade das pesquisadoras autoras sob o Termo do Fiel Depositário.

6.RESULTADOS

6.1 PERFIL DOS PACIENTES SOCIODEMOGRÁFICO, CLÍNICO E TERAPÊUTICO (UNIVARIADA)

O presente estudo é composto por 52 pacientes com LH, onde a maioria dos pacientes apresentam idade <29 anos de idade 67,31% dos pacientes, 55,77% dos pacientes eram sexo feminino e 44,23% do sexo masculino. Cerca de 96,15% pacientes procedentes de Fortaleza e região metropolitana. O gânglio acometido mais prevalente foi o tipo cervical, correspondendo a 67,31% dos casos. Quanto ao estadiamento clínico, (5,77%) pacientes tiveram estágio 1, (40,38%) pacientes tiveram estágio 2, (30,77%) pacientes tiveram estágio 3 e (23,08%) pacientes, estágio 4 (Tabela 1.A).

Do total, 76,92% de pacientes apresentaram sintomas do tipo B (febre por várias semanas, sem infecção, sudorese profunda à noite, perda de peso não intencional de pelo menos 10% do seu peso corporal em seis meses). A maioria dos pacientes estava em estado avançado da doença (82,69%). Com relação ao tipo histológico, o tipo esclerose nodular foi o mais frequente (73,08%), seguido do tipo Celularidade Mista (19,23%) nos pacientes com LH.

Cerca de 42,31% dos pacientes tiveram a presença de linfonodos mediastinais, ou seja, foram mediastino positivo. Cerca de (23,08%) dos pacientes apresentaram presença de linfonodo Bulky (Pres.Bulky: chamado volumoso aquele de mais de um terço do diâmetro do mediastino ou uma massa tumoral de mais de 10 cm de tamanho) e (13,46%) dos pacientes tiveram linfonodos múltiplos locais > 2. Quanto à imunofenotipagem, 98,08% dos pacientes foram positivos CD30+, 80,77%, foram positivos para CD15+ e (38,46%) foram CD20+ (Tabela 1.B).

Tabela 1.A - Distribuição de frequências das variáveis sociodemográficas e clínicas dos pacientes com LH coletados no período 2015-2019.

Variáveis	LH (N:52)
Faixa etária	
18 a 29	35 (67,31%)
30-60	16(30,77%)
>60	1(1,92%)
Sexo	
Masculino	23(44,23%)
Feminino	29(55,77%)
Procedência	
Fortaleza	28(53,84%)
Interior	22(42,31%)
Outro Estado	2(3,85%)
Gânglio Acometido^a	
Cervical	35(67,31%)
Mediastino	5(9,62%)
Supraclavicular	3(5,77%)
Abdominal	1(1,92%)
Axilar	1(1,92%)
Inguinal	1(1,92%)
Mandibula	1(1,92%)
Não relata	5(9,62%)
Estadiamento clínico^b	
1	3(5,77%)
2	21(40,38%)
3	16(30,77%)
4	12(23,08%)

Fonte: Autoria própria

Abreviações: LH – Linfoma de Hodgkin, N: número de amostras ou pacientes

Nota: ^aGânglio acometido relatado no momento do diagnóstico; ^bEstadiamento clínico o estadiamento de acordo com Ann Arbor modificado por Cotswolds: I: Envolvimento de uma região linfonodal ou um órgão/local extranodal sem envolvimento nodal; II: Envolvimento de ≥ 2 regiões linfonodais no mesmo lado do diafragma; III: Envolvimento nodal em ambos os lados do diafragma; IV: Envolvimento difuso ou disseminado \geq um órgão/tecido extranodal além de tecido/órgão extralinfático contíguo \pm linfonodo envolto. Dados expressos como média \pm desvio padrão, e como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses.

Tabela 2.B - Distribuição de frequências das variáveis clínicas dos pacientes com LH coletados no período 2015-2019.

Variáveis	LH (N:52)
Sintomas^c	
A	12(23,08%)
B	40(76,92%)
Estadiamento clínico^b/ Sintomas^c	
1A	3 (5,77%)
2A	9 (17,31%)
2B	12 (23,07%)
3B	16(30,77%)
4B	12(23,08%)
Estágio^d	
Inicial	9(17,31%)
Avançado	43(82,69%)
Tipo histológico^e	
RL	3(5,77%)
EN	38(73,08%)
CM	10(19,23%)
DL	1(1,92%)
Mediastino (MED+)^f	
Positivo	22(42,31%)
Negativo	30(57,69%)
Pres.Bulky^g	
Não	40(76,92%)
Sim	12(23,08%)
Múltiplos locais >2^h	
Não	45(86,54%)
Sim	7(13,46%)
Imunofenotipagemⁱ	
(CD30+)Positivo	51(98,08%)
(CD15+) Positivo	42(80,77%)
(CD20+) Positivo	20(38,46%)

Fonte: Autoria própria

Abreviações: LH – Linfoma de Hodgkin, N: número de amostras ou pacientes, MED: mediastino.

Nota: ^cSintomas A: é a ausência de sintomas relacionados ao linfonodo ou à doença, Sintomas B: Febre que pode estar ligada e desligada por várias semanas, sem infecção, sudorese profusa à noite, perda de peso não intencional pelo menos 10% do seu peso corporal em seis meses; ^dEstádio da doença Inicial (IA, IB e IIA) e avançado (IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB); ^eTipo histológico de acordo com a definição da OMS de 2008 -RL: Rico em Linfócitos, -EN: Esclerose Nodular, - CM: Celularidade Mista, -Depleção Linfocitária; ^f Mediastino (MED+) Considerado o comprometimento de linfonodo em localização mediastinal; ^g Pres.Bulky presença de linfonodo Bulky ou uma massa tumoral de mais de 10 cm de tamanho; ^h Múltiplos locais >2 presença de um ou mais de dois linfonodos supra ou infra transversos; ⁱ imunofenotipagem análise imunohistoquímica de marcadores diagnósticos e características do LH que são CD15, CD30, porém CD20 nem sempre é positivo para todos os pacientes.

Dados expressos como média ± desvio padrão, e como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses.

Nas tabelas 2.A e 2.B, tem-se a distribuição de frequências das variáveis relativas a 1ª abordagem terapêutica, a 2ª abordagem terapêutica e recidiva, tempo de recidiva, TMO, SG, condição e IPS. Observa-se que (51,92%) dos pacientes do presente estudo faziam tratamento apenas com ABVD. E cerca de (69,23%) dos pacientes estavam no 6º ciclo de ABVD no primeiro tratamento. A radioterapia (RTX) foi indicada para (23,08%) dos pacientes. Sobre o perfil de resposta ao primeiro tratamento, (67,31%) dos pacientes apresentaram resposta completa (RC), (28,85%) dos pacientes não responderam (NR) ao tratamento e (3,85%) dos pacientes apresentaram resposta parcial (RP). Uma 2ª abordagem terapêutica foi necessária em 42,31% dos pacientes com LH. A abordagem terapêutica mais utilizada nos mesmos foi o ICE (Rituximab, Ifosfamida, Carboplatina e Fosfato de Etoposídeo. Também chamado de regime R-ICE), visto que 59,09% dos pacientes submetidos a uma nova terapia usaram esse protocolo. Após a 2ª abordagem terapêutica, observamos que 78,85% dos pacientes com LH tiveram RC, 13,46% tiveram RP e 7,69% NR (Tabela 2.A).

Dentre os pacientes, 80,77% não apresentaram recidiva. Dos 19,23% pacientes que tiveram recidiva, 40% tiveram um tempo de recidiva entre 1 e 2 anos. Apenas 26,92% dos pacientes foram submetidos ao transplante de medula óssea. E a sobrevida global dos pacientes com LH foi de menos de 5 anos em 88,46% dos pacientes. Na avaliação da condição final (última notícia ao acompanhamento) dos pacientes, observou-se que a recuperação completa ocorreu em 84,62% pacientes. Apenas 7,69% foram a óbito (Tabela 2.B).

Analisando o escore de índice prognóstico internacional no LH (IPS), verificamos que 38,46% apresentaram escore 3 (60% de sobrevida sem progressão e 78% de sobrevida global) e 32,69% apresentaram score 2 (67% de sobrevida sem progressão e 81% de sobrevida global) (Tabela B).

Tabela 3.A - Distribuição de frequências das variáveis relativas a 1ª e 2ª abordagem terapêutica dos pacientes coletados no período 2015-2019.

Variáveis	Frequência n=52(%)
Primeiro Tx com ABVD^a	
5	1(1,92%)
6	36(69,23%)
8	15(28,85%)
Apenas ABVD^b	
Não	25(48,08%)
Sim	27(51,92%)
RTX^c	
Não	40(76,92%)
Sim	12(23,08%)
1ª Resposta^d	
NR	15(28,85%)
RC	35(67,31%)
RP	2(3,85%)
2ª terapia^e	
Não	30(57,69%)
Sim	22(42,31%)
2ª abordagem terapêutica^f (n=22)	
ABVD	1(4,55%)
ICE	13(59,09%)
CMVA	1(4,55%)
ESHAP	1(4,55%)
DHAP	5(22,73%)
GEMP	1(4,55%)
GVD/GMZ	3(13,64%)
RTX	1(4,55%)
2ª Resposta^g	
NR	4(7,69%)
RC	41(78,85%)
RP	7(13,46%)

Fonte: Autoria própria

Abreviações: Tx: tratamento, RXT: radioterapia, ABVD: doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina, ICE: ifosfamida, carboplatino e fosfato de etoposídeo, CMVA: Platinum, Etoposídeo, ARAC-C, Dacarbazina; ESHAP: etoposídeo, metilprednisolona, citarabina em altas doses e cisplatina, DHAP: dexametasona, citarabina em altas doses e cisplatina, GEMP: protocolo com Gencitabina, GVD/GMZ: gencitabina, vinorelbina e doxorubicina/ gemcitabina, dexametasona e cisplatino. Nota: ^a Primeiro Tx com ABVD: número de ciclos do tratamento de primeira linha; ^b Apenas ABVD: pacientes que estavam apenas com o tratamento ABVD sem radioterapia ou qualquer outro protocolo; ^c RTX: Pacientes que tiveram ou não terapia combinada de quimioterapia e Radioterapia; ^d 1ª Resposta: primeira avaliação do paciente após o tratamento de primeira linha; ^e 2ª terapia: pacientes que foram aos protocolos indicados após experimentar a primeira linha; ^f 2ª abordagem terapêutica: Estes são usados se o linfoma não entrar em remissão completa com o primeiro tratamento ou se voltar após o tratamento de primeira linha com ABVD; ^g 2ª Resposta: avaliação após tratamento de segunda linha, Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses.

Tabela 4.B - Distribuição de frequências das variáveis relativas a 2ª recidiva, tempo de recidiva, TMO, SG, condição e IPS dos pacientes coletados no período 2015-2019.

Variáveis	Frequência n=52(%)
Recidiva^h	
Sim	10(19,23%)
Não	42(80,77%)
Tempo recidivaⁱ	
<1ano	3(30,00%)
1-2anos	4(40,00%)
Maior que 2 anos	3(30,00%)
TMO^j	
Sim	14(26,92%)
Não	38(73,08%)
SG^k	
< 5 anos	46(88,46%)
> 5anos	6(11,54%)
Condição Final^l	
Óbito	4(7,69%)
Sem resposta	2(3,85%)
Espectante	1(1,92%)
Resp.Completa	44(84,62%)
Resp.Parcial	1(1,92%)
IPS^m	
1	2(3,85%)
2	17(32,69%)
3	20(38,46%)
4	12(23,08%)
5	1(1,92%)

Fonte: Autoria própria

Abreviações:Tx: tratamento, RXT: radioterapia, ABVD: doxorubicina, bleomicina, vinblastina e dacarbazina, ICE: ifosfamida, carboplatino e fosfato de etoposídeo, CMVA:, Platinum, Etoposide, ARAC-C, Dacarbazina; ESHAP: etoposídeo, metilprednisolona, citarabina em altas doses e cisplatina, DHAP: dexametasona, citarabina em altas doses e cisplatina, GEMP: protocolo com Gencitabina, GVD/GMZ: gencitabina, vinorelbina e doxorubicina/ gencitabina, dexametasona e cisplatino; TMO: Transplante de células-tronco saudáveis (células formadoras de sangue) para substituir suas próprias células-tronco destruídas por doenças, radioterapia ou altas doses de quimioterapia;SG:Sobrevida Global;IPS: Índice pronóstico internacional en el linfoma de Hodgkin. Nota: hRecidiva: Pacientes que tiveram ou não recaída da doença; iTempo recidiva: período de tempo desde o aparecimento da recidiva, as possíveis recaídas ocorrem quase sempre nos primeiros 2 ou 3 anos após o tratamento, sendo extremamente raras as recaídas após 5 anos; jTMO: pacientes que fizeram ou não um transplante como tratamento alternativo;kSG: tempo de sobrevida ate o evento do primer óbito; lCondição Final: última notícia que é notificada no prontuário do paciente; IPS: pontuação de 1 a 7 atribuída aos pacientes para diagnosticar sobrevida livre de progressão ou global. Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses.

Observamos uma expressão positiva da proteína PD-1 em 50%, PD-L1 em 86,54% e CTLA4 em 75% nos pacientes com LH (Tabela 5) .

Analisando quanto a intensidade de marcação das proteínas, PD-1, PD-L1 e CTLA-4 (tabela 5), observa-se que: a proteína PD-1 apresentou-se com maior intensidade de marcação em (35,48%) dos pacientes, moderada em 25,81%, fraca em 22,58% e negativa em 16,13% dos pacientes com LH. A proteína PD-L1, a maioria dos pacientes teve classificação forte (20 pacientes – 38,46%), seguida da classificação moderada (17 pacientes – 32,69%), fraca (8 pacientes – 15,38%) e negativa (7 pacientes – 13,46%). A proteína CTLA-4 apresentou em sua maioria positividade com intensidade fraca 36,54%, seguida de intensidade moderada 23,08%, forte em 15,38% e ausente em 25% dos pacientes com LH.

Tabela 5 - Distribuição de frequências da expressão das proteínas CTLA-4, PD-L1 e PD-1 dos pacientes com LH coletados no período 2015-2019.

Expressão das proteínas	Intensidade de expressão n=52(%)	Positividade*	
		(+/-) n	%
PD-1c	n= 31 5(16,13%) 7(22,58%) 8(25,81%) 11(35,48%)	Positivo	26 50
Negativo		5 9,62	
Fraco			
Moderado			
Forte			
PD-L1b	7(13,46%) 8(15,38%) 17(32,69%) 20(38,46%)	Positivo	45 86,54
Negativo		7 13,46	
Fraco			
Moderado			
Forte			
CTLA-4a	13(25%) 19(36,54%) 12(23,08%) 8(15,38%)	Positivo	39 75
Negativo		13 25	
Fraco			
Moderado			
Forte			

Fonte: Autoria própria

Abreviações: PD-1: Proteína morte programada 1; PD-L2: Ligando da proteína da Morte programada 1; CTLA-4: Proteína T- linfócito-associada citotóxica 4.
Nota: abc: classificação da análise das amostras por intensidade e positividade do número de células marcadas ou ausência de células com marcação positiva.
*Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses.

6.2 ABORDAGEM SÓCIODEMOGRÁFICO, CLÍNICO E TERAPÊUTICO EM ASSOCIAÇÃO COMPD-1, PD-L1 E CTLA-4 (ANÁLISE BIVARIADA)

Na análise de associação entre a expressão proteica com as variáveis socio-demográficas. Observamos uma maior expressão positiva das proteínas nos pacientes com faixa etária < 29 anos. No entanto, não observamos associação estatisticamente significativa entre a idade com a expressão proteica positiva de PD-1, PD-L1 e CTLA4 ($p=0,593$), ($p=0,094$) e ($p=0,609$) respectivamente. (Tabela 6).

Observamos que a positividade da expressão proteica de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 foi maior no sexo feminino, porém não houve associação estatisticamente significativa da expressão proteica com o sexo ($p>0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação do perfil de expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com as características sociodemográficas dos pacientes com LH.

Variáveis	PD-1 (n=31)			PD-L1 (n=52)			CTLA4 (n=52)		
	Positivo	Negativo	Valor p	Positivo	Negativo	Valor p	Positivo	Negativo	Valor p
Faixa Etária									
18 – 29 anos	19(61,30%)	4(12,90%)		32(61,54%)	3(5,76%)	0,094	26(50,00%)	9(17,31%)	0,609
30-60 anos	7(22,58%)	1(3,22%)	0,593	12(23,08%)	4(7,69%)		13(25,00%)	3(5,76%)	
60 anos	0	0		1(1,93%)	0		0	1(1,93%)	
Sexo									
Masculino	9(29,04)	17(54,84)	1	1(40,39%)	2(3,84%)	0,444	18(34,62%)	5(9,62%)	0,629
Feminino	17(54,84)	4(12,90%)		24(46,15%)	5(9,62%)		21(40,38%)	8(15,38%)	

Fonte: Autoria própria

Abreviações: PD-1: Proteína morte programada 1; PD-L2: Ligante da proteína da Morte programada 1; CTLA-4: Proteína T- linfócito- associada citotóxico 4. Nota: Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses. * uso do teste de Qui-quadrado de Pearson, ** Emprego do teste Exato de Fisher. Significância estatística de ($p<0,05$).

Na tabela 7 foi realizado a associação das expressões de CTLA-4, PD-L1 e PD-1 com as variáveis clínicas.

Observa-se que o estágio 2 e 3 possui o maior percentual de casos positivos, com 26,92% para os dois casos, seguido do estágio 4, com 15,38% e o estágio 1 com 5,77% de positividade. Porém, não observamos associação estatística entre a expressão das proteínas CTLA-4 ($p=0,629$), PD-L1 ($p=0,444$) e PD-1 ($p=1$) com relação ao estadiamento clínico.

No quesito sintomas, aqueles que tiveram o sintoma A (quando nenhum dos sintomas B existe, a letra "A" é adicionada), possuem menor percentual de casos positivos de CTLA-4, também o mesmo para PD-L1 e PD-1, foi maior a porcentagem no caso de sintomas B em positividade das 3 proteínas. No entanto, em nenhum dos casos houve diferença estatisticamente significativa. Logo, pode-se concluir que não existe associação do sintoma com as expressões CTLA-4, PD-L1 e PD-1.

Quanto ao estágio, o nível avançado teve maiores porcentagens positivas, mas não houve associação estatisticamente significativa com a expressão das proteínas ($p=0,253$) para CTLA-4, e ($p=1$) para PD-L1 e PD-1. Observamos maior positividade das proteínas com o tipo histológico esclerose nodular (EN), mas não se encontrou associação significativa com a expressão proteica CTLA-4 ($p=0,807$) para PD-L1 ($p=1$) e para PD-1 ($p=0,229$).

Avaliando o valor médio das expressões proteicas de acordo com a presença de comprometimento no mediastino MED+, observamos associação estatisticamente significativa entre a expressão CTLA-4 com os pacientes que não possuíam MED+ ($p=0,049$). Não observamos associação entre as expressões PD-L1 e PD-1 com o comprometimento no mediastino ($p=1$) para ambas as proteínas (Tabela 7).

Para aqueles que apresentaram a complicação *Pres. Bulky*, também não houve diferenças significativas em nenhuma das expressões sendo o valor de p para CTLA-4 (0,706), PD-L1 (1) e PD-1 (1).

Tabela 7 - Variáveis clínicas e complicações vs proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 dos pacientes coletados no período 2015-2019.

Variáveis*	PD-1			PD-L1			CTLA-4			
	n	Negativo	Positivo	Valor p**	Negativo	Positivo	Valor p**	Negativo*	Positivo*	Valor p**
Estadio clínicoa										
1	3 (5,77%)	0 (0%)	2 (6,45%)	0,872	0 (0%)	3 (5,77%)	0,431	0 (0%)	3 (5,77%)	0,349
2	21(40,38%)	3 (9,68%)	9 (29,03%)		5 (9,62%)	16(30,77%)		7 (13,46%)	14(26,92%)	
3	16(30,77%)	1 (3,23%)	10 (32,26%)		1 (1,92%)	15(28,85%)		2 (3,85%)	14(26,92%)	
4	12(23,08%)	1 (3,23%)	5 (16,13%)		1 (1,92%)	11(21,15%)		4 (7,69%)	8 (15,38%)	
Sintomasb										
A	12(23,07%)	1 (3,23%)	8(25,81%)	1	1 (1,92%)	11(21,15%)	1	1 (1,92%)	11(21,15%)	0,253
B	40(79,92%)	4(12,90%)	18(58,06%)		6(11,54%)	34(65,38%)		12(23,08%)	28(59,62%)	
Estágioc										
Inicial	9 (17,31%)	1 (3,23%)	6 (19,35%)	1	0 (0%)	9 (17,31%)	0,331	1 (1,92%)	8 (15,38%)	0,42
Avançado	43(82,69%)	4(12,90%)	20(64,52%)		7(13,46%)	36(69,23%)		12(23,08%)	31(59,62%)	
Tipo histológicod										
RL	3 (5,77%)	0 (0%)	3 (9,68%)	0,229	0 (0%)	3 (5,77%)	1	0 (0%)	3 (5,77%)	0,807
EN	38(73,08%)	3(9,68%)	20(64,52%)		6(11,54%)	32(61,54%)		10(19,23%)	28(53,84%)	
CM	10(19,23%)	2 (6,45%)	3 (9,68%)		1 (1,92%)	9 (17,31%)		3 (5,77%)	7 (13,46%)	
DL	1 (1,92%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	1 (1,92%)		0 (0%)	1 (1,92%)	

MED+e					
Não	30(57,69%)	3(9,68%)	16(51,61%)	1	4(7,69%) 26(50,00%)
Sim	22(42,31%)	2(6,45%)	10(32,26%)	1	9(17,31%) 13(25,00%)
Pres.Bulkyf					
Não	40(76,92%)	4(12,90%)	22(70,97%)	1	11(21,15%) 29(55,78%)
Sim	12(23,08%)	1(3,23%)	4(12,90%)	1	2(55,77%) 10(19,23%)

Fonte: Autoria própria

Abreviações: LH – Linfoma de Hodking, N: número de amostras ou pacientes, MED+: mediastino, PD-1: Proteínamorte programada 1; PD- L2: Ligando da proteína da Morte programada 1; CTLA-4: Proteína T-linfócito-associada citotóxica 4. Nota: ^aEstadiamento clínico o estadiamento de acordo com Ann Arbor modificado por Cotswolds: I: Envolvimento de uma região linfonodal ou um órgão/local extranodal sem envolvimento nodal; II: Envolvimento de ≥ 2 regiões linfonodais no mesmo lado do diafragma; III: Envolvimento nodal em ambos os lados do diafragma;IV: Envolvimento difuso ou disseminado \geq um órgão/tecido extranodal além de tecido/órgão extralinfático contíguo \pm linfonodo envuelto; ^bSintomas A: é a ausência de sintomas relacionados ao linfonodo ou à doença, Sintomas B: Febre que pode estar ligada e desligada por várias semanas, sem infecção, sudorese profusa à noite, perda de peso não intencional pelo menos 10% do seu peso corporal em seis meses; ^cEstágio da doença Inicial (IA, IB e IIA) eavuçado (IIB, IIIA, IIB, IVA e IVB); ^dTipo histológico de acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde de 2008 -RL: Riscoem Linfocitos, -EN: Esclerose Nodular, - CM: Celularidade Mista, -Depleação Linfocitaria; ^eMediastino (MED+) Considerado o comprometimento de linfonos em localização mediastinal; ^f Pres.Bulky presença de linfonodo Bulky ou uma massa tumoral de mais de10 cm de tamanho. Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses.* uso do teste de Qui-quadrado de Pearson, ** Emprego do teste Exato de Fisher. Significância estatística de (p<0,05).

Na tabela 8 foi relacionado às expressões estudadas com os tipos de imunofenotipagem. Pode-se observar a marcação de CD15+, CD20+, CD30+ não apresentou associação estatisticamente significativa com as expressões dos marcadores imunológicos PD-1 ($p=1$), PD-L1 ($p=0,322$) e CTLA-4 ($p=0,419$).

Em relação, as variáveis referentes a 1ª abordagem terapêutica, as categorias de 6 e 8 ciclos possuem maior quantidade de casos, e os demais possuem CTLA-4 positivo em aproximadamente 76,93% dos pacientes, no entanto não observamos associação estatisticamente significativa com a expressão das proteínas ($p>0,05$).

O uso exclusivo do ABVD apresentou associação estatisticamente significativa com a expressão positiva da proteína PD-L1 ($p=0,046$). A expressão de PD-1 e CTLA4 não apresentou associação com o uso do ABVD ($p=0,624$) e ($p=0,149$) (Tabela 6).

Com relação ao uso de RTX, não observamos associação significativa com a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA4 ($p=0,553$), ($p=0,656$) e ($p=0,466$), respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 - Associação da expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 com as variáveis imunofenotípicas, primeiro tratamento com ABVD, somente ABVD e RTX no pacientes com LH.

Variáveis*	n	PD-1		Valor p**	PD-L1		Valor p**	CTLA-4		
		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo		Negativo	Positivo	
CD15+^a										
Negativo	10(19,23%)	1 (3,23%)	4 (12,90%)	1	0 (0%)	10(19,23%)	0,322	1(1,92%)	9 (17,31%)	0,419
Positivo	42(80,77%)	4(12,91%)	22(70,97%)		7(13,46%)	35(67,31%)		12(23,08%)	30(57,69%)	
CD20+^b										
Negativo	32(61,54%)	4(12,90%)	14(45,16%)	0,368	4 (7,69%)	28(53,85%)	1	9 (17,31%)	23(44,23%)	0,743
Positivo	20(38,46%)	1 (3,23%)	12(38,71%)		3 (5,77%)	17(32,69%)		4 (7,69%)	16(30,77%)	
CD30+^c										
Negativo	1 (1,92%)	0 (0%)	0 (0%)	0,5	0 (0%)	1 (1,92%)	1	1 (1,92%)	0 (0%)	0,25
Positivo	51(98,07%)	5(16,13%)	26(83,87%)		7(13,46%)	44(84,62%)		12(23,08%)	9 (17,31%)	
Primeiro Tx com ABVD^d										
5	1 (1,92%)	0 (0%)	7 (22,58%)	0,145	0 (0%)	1 (1,92%)	0,647	0 (0%)	1 (1,92%)	0,244
6	36(69,23%)	1(3,23%)	17(54,84%)		6(11,54%)	31(59,62%)		11(21,15%)	25(48,08%)	
8	15(28,85%)	2(6,45%)	4 (12,90%)		0 (0%)	15(28,85%)		0 (0%)	15(28,85%)	
Apenas ABVD^e										
Não	25(48,08%)	1 (3,23%)	11(35,48%)	0,624	6(11,54%)	19(36,54%)	0,046**	4 (7,69%)	21(40,38%)	0,149
Sim	27(51,93%)	4(12,90%)	15(48,39%)		1 (1,92%)	26(50,00%)		9 (17,31%)	18(34,62%)	
RTX^f										
Não	40(76,92%)	5(16,13%)	20(64,52%)	0,553	5 (9,62%)	35(63,31%)	0,656	9 (17,31%)	31(59,62%)	0,466
Sim	12(23,08%)	0 (0%)	6(19,35%)		2(3,85%)	10(19,23%)		4 (7,69%)	8 (15,38%)	

Fonte: Autoria própria

Abreviações: Tx: tratamento, RXT: radioterapia, ABVD: doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina, PD-1: Proteína morte programada 1; PD-L2: Ligante da proteína da Morte programada 1; CTLA-4: Proteína T-linfócito-associada citotóxica 4. Nota: a CD15: positividade ou negatividade do marcador; b CD20: positividade ou negatividade do marcador; c CD30: positividade ou negatividade do marcador; d Primeiro Tx com ABVD: número de ciclos do tratamento de primeira linha; e Apenas ABVD: pacientes que estavam apenas com o tratamento ABVD sem radioterapia ou qualquer outro protocolo; f RTX: Pacientes que tiveram ou não terapia combinada de quimioterapia e Radioterapia. Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses. * uso do teste de Qui-quadrado de Pearson, ** Emprego do teste Exato de Fisher. Significância estatística de ($p < 0,05$).

Na tabela 9, Observamos associação entre a expressão positiva de PD-1 e a primeira resposta ao tratamento com resposta completa (RC) 61,29% ($p=0,042$). Apesar da expressão positiva de PD-L1 e CTLA4 com RC no primeiro tratamento ser de 55,77% e 48,08%, respectivamente, não observamos associação significativa do primeiro tratamento as proteínas CTLA-4 ($p=0,848$), PD-L1 ($p=0,745$).

A associação com segunda terapia, foi encontrado diferenças entre quem fez e quem não fez a segunda terapia. Observamos que a expressão positiva da proteína PD-1 associou com os pacientes que não fizeram uso da segunda terapia ($p=0,008$). Não observamos associação com a necessidade de segunda terapia e a expressão de PD-L1 ($p=0,685$) e CTLA4 ($p=0,518$).

Com relação a 2ª resposta ao tratamento, se observa que os pacientes com RC foram os que tiveram a maior proporção de positividade para a proteína CTLA-4 com 59,62% dos casos. Observamos associação entre a expressão positiva de CTLA4 com a resposta completa do segundo tratamento ($p=0,023$). Não observamos associação entre a expressão positiva de PD-1 e PD-L1 com a segunda resposta ($p>0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Associação da expressão dos referentes a abordagem terapêutica vs as proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 dos pacientes com LH.

Variáveis* (n=52)	PD-1			PD-L1			CTLA-4		
	Negativo	Positivo	Valor p**	Negativo	Positivo	Valor p**	Negativo	Positivo	Valor p**
Resposta 1ª terapia									
Não Responde	4(12,90%)	6(19,35%)	0,042**	1 (1,92%)	14(26,92%)	0,745	3 (5,77%)	12 (23,08%)	0,848
Resp.Completa	1 (3,23%)	19(61,29%)		6(11,54%)	29(55,77%)		10(19,23%)	25 (48,08%)	
Resp.Parcial	0 (0%)	1(3,23%)		0 (0%)	2 (3,85%)		0 (0%)	2 (3,85%)	
2ª da terapia^b									
Não	0 (0%)	18(58,06%)	0,008**	5 (9,62%)	25(48,08%)	0,685	9 (17,31%)	21 (40,38%)	0,518
Sim	5(16,13%)	8 (25,81%)		2 (3,85%)	20(38,46%)		4 (7,69%)	18 (34,62%)	
Resposta 2ª terapia									
Não Responde	1 (3,23%)	1 (3,23%)	0,525	0 (0%)	4 (7,69%)	1	3 (5,77%)	1 (1,92%)	0,023**
Resp.Completa	4(12,90%)	23(74,19%)		6(11,54%)	35(67,31%)		10 (19,23%)	31 (59,62%)	
Resp.Parcial	0 (0%)	2 (6,45%)		1(1,92%)	6 (11,54%)		0 (0%)	7 (13,46%)	

Fonte: Autoria própria

Abreviações: LH: Linfoma de Hodgkin, PD-1: Proteína morte programada 1; PD-L2: Ligante da proteína da Morte programada 1; CTLA-4: Proteína T-Infócito-associada citotóxica 4. Nota: ^a1ra Resposta: primeira avaliação do paciente após o tratamento de primeira linha; ^b2da terapia: pacientes que foram aos

protocolos indicados após experimentar a primeira linha; ^b 2da abordagem terapêutica: Estes são usados se o linfoma não entrar em remissão completa com o primeiro tratamento ou se voltar após o tratamento de primeira linha com ABVD; ^c 2da Resposta: avaliação após tratamento de segunda linha. Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses. * uso do teste Qui-quadrado de Pearson, ** Emprego do teste Exato de Fisher. Significância estatística (p<0,05).

Na tabela 10 estão descritos as associações entre a recidiva, tempo de recidiva, TMO, sobrevida global, condição e IPScom as expressões PD-1, PD-L1 e CTLA-4.

Foi possível constatar associação estatisticamente significativa entre a expressão positiva de CTLA-4 e a condição final, com RC em 67,31% dos pacientes com LH (p=0,045). Não observamos associação significativa entre a recidiva, o tempo de recidiva, tranplante de medula óssea (TMO), a sobrevida Global (SG) com a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 (p>0,05).

Tabela 10 - Recidiva, tempo de recidiva, TMO, SG e condição vs proteínas PD-1, PD-L1 E CTLA-4 dos pacientes com LH no período 2015-2019.

Variáveis*	N	PD-1			PD-L1			CTLA-4		
		Negativo	Positivo	Valor p**	Negativo	Positivo	Valor p**	Negativo	Positivo	Valor p**
Recidiva ^a										
Não	42(80,77%)	3(9,68%)	22(70,98%)	0,241	5(9,62%)	37(71,15%)	0,608	12(23,08%)	30(57,69%)	0,419
Sim	10(19,23%)	2(6,45%)	4 (12,90%)		2(3,85%)	8 (15,38%)		1 (1,92%)	9 (17,31%)	
Faixa de tempo recidiva ^b										
<1ano	3 (5,77%)	1(3,23%)	0 (0%)	0,6	1(1,92%)	2 (3,85%)	0,467	0 (0%)	3 (5,77%)	1

1-2anos	4 (7,69%)	1(3,23%)	2 (6,45%)	0 (0%)	4 (7,69%)	1 (1,92%)	3 (5,77%)
Maior que 2 anos	3 (5,77%)	0 (0%)	2 (6,45%)	1(1,92%)	2 (3,85%)	0 (0%)	3 (5,77%)
TMO^c							
Não	38(73,01%)	2(6,45%)	19(61,29%)	0,296	32(61,54%)	11(21,15%)	27(51,92%)
Sim	14(26,92%)	3(9,68%)	7 (22,58%)		13 25,00%)	2 (3,85%)	12(23,08%)
SG^d							
< 5 anos	4 (88,46%)	3(9,68%)	24(46,15%)	0,112	39(75,00%)	13(25,00%)	33(63,46%)
> 5anos	6 (11,54%)	2(6,45%)	2 (6,45%)		6 (11,54%)	0 (0%)	6 (11,54%)
Condição final^e							
Óbito	4 (7,69%)	1(3,23%)	2 (6,45%)	0,613	3 (5,77%)	3 (5,77%)	1 (1,92%)
Sem resposta	2 (3,85%)	0 (0%)	2 (6,45%)		1 (1,92%)	0 (0%)	2 (3,85%)
Espectante	1 (1,92%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (1,92%)	0 (0%)	1 (1,92%)
Resp. Completa	44(84,62%)	4(12,90%)	22(70,97%)		39(75,00%)	9 (17,31%)	35(67,31%)
Resp. Parcial	1 (1,92%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (1,92%)	1 (1,92%)	0 (0%)

Fonte: Autoria própria

Abreviações: PD-1: Proteína morte programada 1; PD-L2: Ligando da proteína da Morte programada 1; CTLA-4: Proteína T- linfócito-associada citotóxica 4. Nota:

^aRecidiva: Pacientes que tiveram ou não recaída da doença; ^bTempo recidiva: período de tempo desde o aparecimento da recidiva, as possíveis recaídas ocorrem quase sempre nos primeiros 2 ou 3 anos após o tratamento, sendo extremamente raras as recaídas após 5 anos; ^c TMO: pacientes que fizeram ou não um transplante como tratamento alternativo;^d SG: tempo de sobrevida até o evento do primer óbito; ^e Condição Final: última notícia que é notificada no prontuário do

paciente; IPS: pontuação de 1 a 7 atribuída aos pacientes para diagnosticar sobrevida livre de progressão ou global. Dados expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses. * uso do teste de Qui-quadrado de Pearson, **Emprego do teste Exato de Fisher. Significância estatística de ($p < 0,05$).

Foram analisadas as associações do escore IPS com a expressão das três proteínas, descritos na tabela 11. Sabe-se que o escore IPS varia de 1 a 7, sendo uma forma de apresentar esses dados para cada proteína é através do valor médio, e conforme os resultados, vemos, por exemplo, que o IPS médio das amostras de CTLA-4 negativas foi 3, com desvio padrão de 1,22. As amostras com CTLA-4 positivo tiveram IPS médio 2,82, com desvio de 0,76. Apesar do IPS ser um pouco menor nas amostras positivas, é necessário o teste de significância para comprovar que essa diferença é estatisticamente relevante. Portanto, foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Não observamos associação significativa entre o escore IPS e a expressão de PD-1, PD-L1 E CTLA-4 ($p=0,752$), ($p=0,734$) e ($p=0,468$), respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11 - IPS vs proteínas PD-1, PD-L1 E CTLA-4 dos pacientes coletados com LH no período 2015-2019.

Proteínas*	IPS	
	Média (d.p.)	Valor p**
PD-1		
Negativo	2,8 (0,84)	0,752
Positivo	2,92 (0,89)	
PD-L1		
Negativo	2,71 (1,11)	0,734
Positivo	2,89 (0,86)	
CTLA-4		
Negativo	3 (1,22)	0,468
Positivo	2,82 (0,76)	

Fonte: Autoria própria

Abreviações: IPS: Índice prognóstico internacional do LH, PD-1: proteína de morte programada 1; PD-L2: ligante da proteína de morte programada 1; CTLA-4: proteína T-linfócito-associada citotóxica 4. Nota: significância da sobrevida geral e livre de progressão. Para tal foi aplicado o teste de Mann-Whitney, os valores p foram todos $>0,05$, então ao nível de 5% de significância ($p<0,05$).

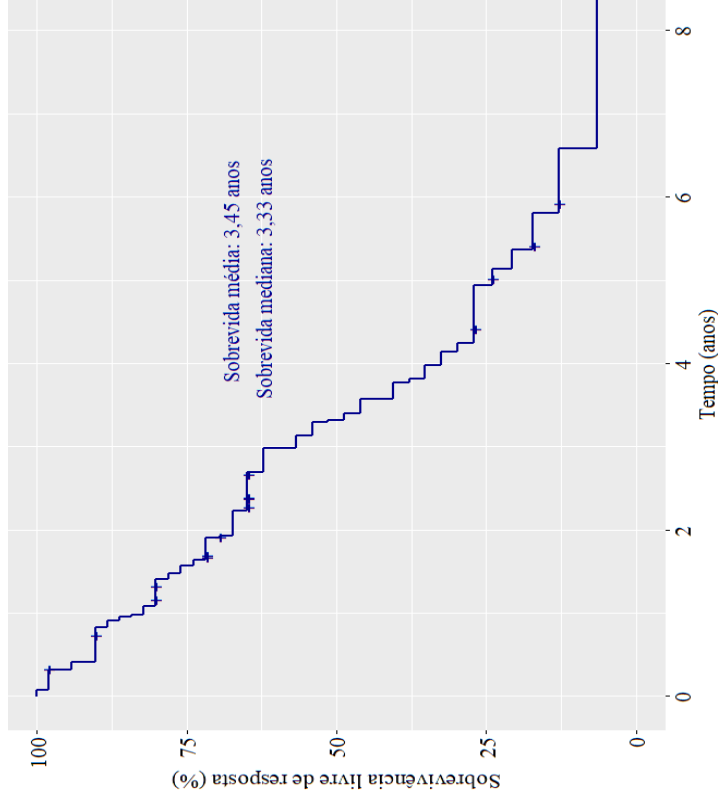
6.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA EM ASSOCIAÇÃO COM PROTEÍNAS PD-1, PD-L1 E CTLA-4

Para a análise de sobrevida, foi usado o tempo em anos desde o diagnóstico do caso até a última notificação de cada paciente, e o evento considerado foi a primeira resposta do paciente e de censura os demais casos, que não chegaram a ter nenhuma recuperação.

Primeiramente, apresentamos no gráfico 1 a curva de sobrevida estimada de Kaplan-Meier para todos os pacientes em estudo considerados até 10 anos e 5 anos após diagnóstico, percebe-se que a mediana de sobrevida livre de resposta (SLE) ao primeiro tratamento de primeira linha é de 3,33 tanto em 10 anos (Gráfico 1) como em 5 anos (Gráfico 2).

Nos Gráfico 3 e 4 temos a análise da curva de sobrevida de Kaplan Meier, de acordo com as categorias de positividade de CTLA-4, analisadas em 10 e 5 anos após o diagnóstico. Afim de saber se existe associação da proteína CTLA-4 com a SLE do paciente, foi aplicado o teste de log-rank, onde não observamos associação da expressão positiva de CTLA4 com a SLE ($p=0,48$) em 10 anos após o diagnóstico e ($p=0,55$) em até 5 anos após o diagnóstico, respectivamente. Outras informações também podem ser obtidas através da tabela 11.

Gráfico 1 - Curva de sobrevida livre de resposta (SLE) de Kaplan-Meier dos pacientes, com intervalo de confiança de 95%. (até 10 anos).

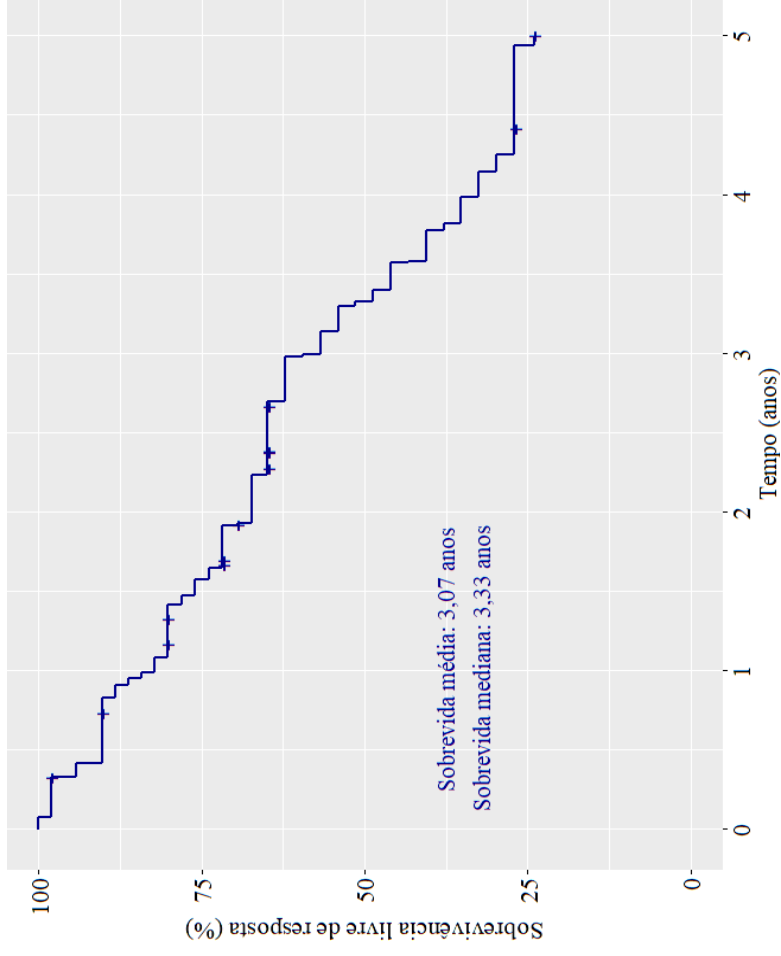


Fonte: Autoria própria

Nota: Calculou-se o tempo médio e mediano de sobrevida de 10 anos.

Dados: Foi utilizado o método de Kaplan-Meier.

Gráfico 2 - Curva de sobrevida livre de resposta (SLE) de Kaplan-Meier dos pacientes, com intervalo de confiança de 95% (até 5 anos).

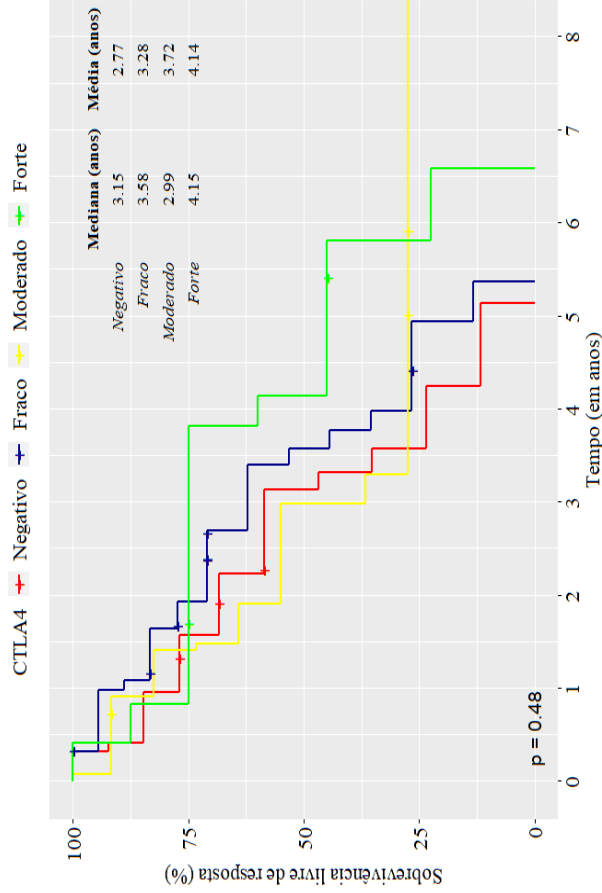


Fonte: Autoria própria

Nota: Calculou-se o tempo médio e mediano de sobrevida de 5 anos.

Dados: Foi utilizado o método de Kaplan-Meier.

Gráfico 3 - Gráfico 3 - Curva de sobrevivida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por CTLA-4 (até 10 anos).

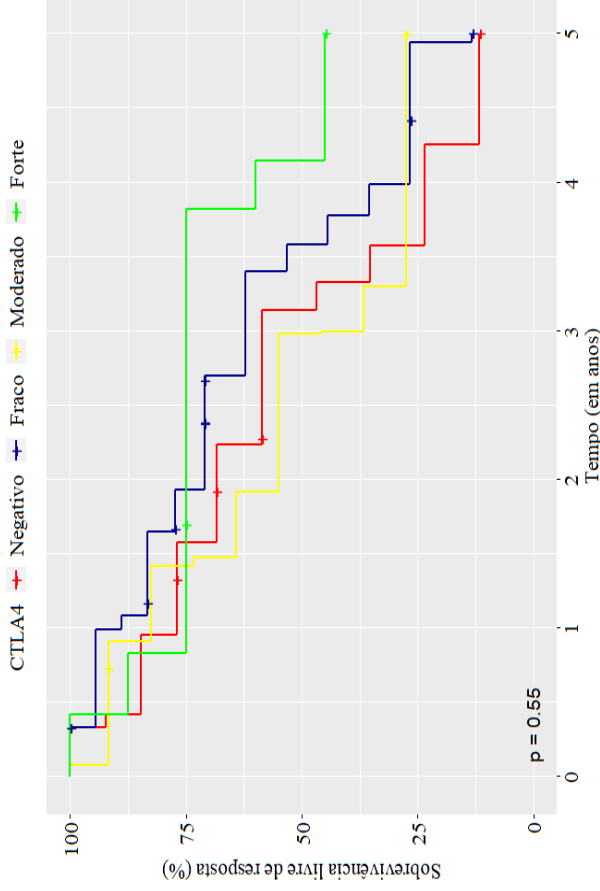


Fonte: Autoria própria

Nota: A relação de sobrevivida e expressão. De CTLA-4 criado por 10 anos inicialmente, a curva começa com o melhor tempo para aqueles que expressaram CTLA-4 fraco e moderado, porém, em geral, aqueles com o melhor andamento livre de eventos foram aqueles que expressaram CTLA-4 forte, então pode-se dizer que não é um mau prognóstico em relação aoseventos adversos, comprovando que não foi estatisticamente significativo (p 0,48).

Dados: Foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevivida entre dois ou mais grupos.

Gráfico 4 - Curva de sobrevivida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por CTLA-4 (até 5 anos).



Fonte: Autoria própria

Nota: A relação de sobrevivida e expressão do CTLA-4 proposto para 5 anos, observa-se com mais detalhes aquele que inicia moderado e fraco com maior tempo livre de eventos, mas em geral o que apresenta o melhor tempo de sobrevivida livre de qualquer evento contemplado neste estudo foi a forte expressão, o valor de p não foi significativo deixando analisar que a expressão não foi existe uma relação com a SLE (p 0,55).

Dados: Foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevivida entre dois ou mais grupos.

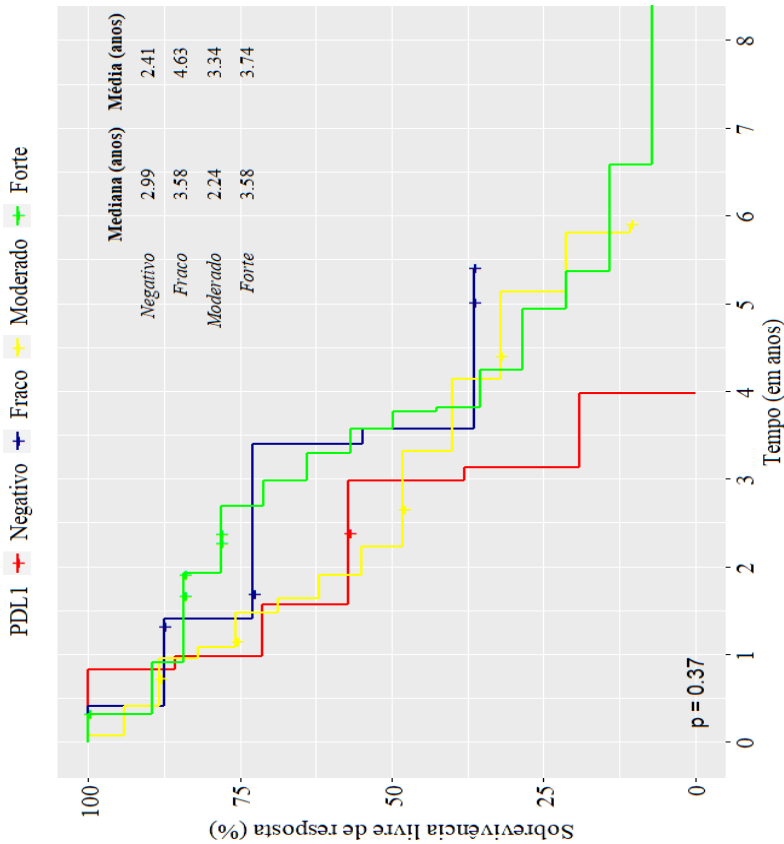
Avaliando agora o tempo de SLE de acordo com a expressão PD-L1, nos gráficos 5 e 6, observamos no teste de Log-rank que a expressão positiva de PD-L1 não associou com a menor SLE em pacientes com com valor de ($p=0,37$) e de ($p=0,41$), para os tempos de diagnóstico de 10anos e até 5 anos, respectivamente. Logo, podemos concluir que não há diferenças de sobrevida livre de resposta dos pacientes com classificações negativa, moderada ou forte de PD-L1.

Nos gráficos 7 e 8, temos as análises de SLE dos pacientes com LH de acordo com os grupos de classificação da expressão PD-1. Observamos nos gráficos 7 e 8 que a expressão positiva de PD-1 de intensidade moderada associou com menor SLE com mediana de 1,53 anos, tanto em 10 anos ($p<0,0001$) como em 5 anos ($p=0,00027$).

A análise de sobrevida livre de progressão (SLE) foi associada com a expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA4 juntas nos pacientes com LH considerando suas categorias como negativo e positivo para os tempos de diagnóstico de 10 anos e até 5 anos (Gráfico 9 e 10).

Observamos que a expressão negativa de PD-L1 apresentou menor mediana de Sobrevida livre de progressão (SLE) de 2,99 anos, já os pacientes com PD-1 positivo apresentam maior SLE com mediana de 6,59 anos, no entanto, não houve associação estatisticamente significativa entre as expressões positivas das proteínas e a menor SLE nos pacientes com LH tanto na análise de 10 anos ($p=0,059$) como na análise de SLE de 5 anos após o diagnóstico ($p=0,13$) (Gráfico 9).

Gráfico 5 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-L1 (até 10 anos).

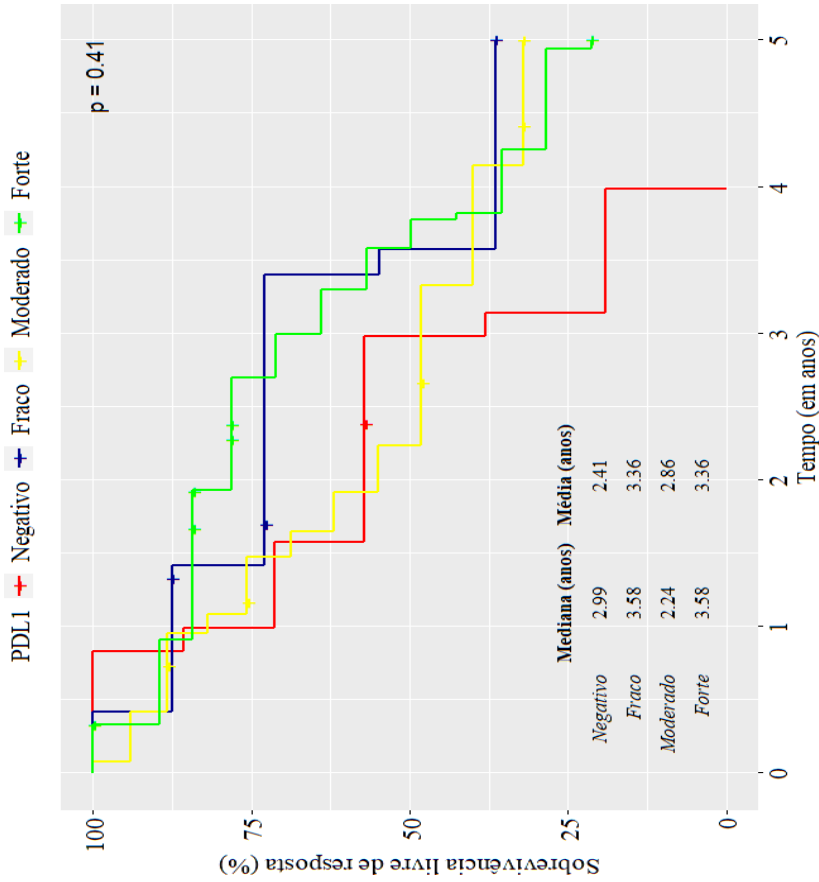


Fonte: Autoria própria

Nota: A relação de sobrevida e expressão do PD-L1 proposto para 10 anos de melhor tempo constante foi a expressão fraca e a de mais eventos encontrados foi a expressão negativa e a de melhor tempo de sobrevida em geral mais tem menor constante em apresentação dos eventos considerados o valor de p não foi significante deducindo que não tem relação estatística (p 0,37).

Dados: Foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos.

Gráfico 6 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-L1 (até 5 anos).

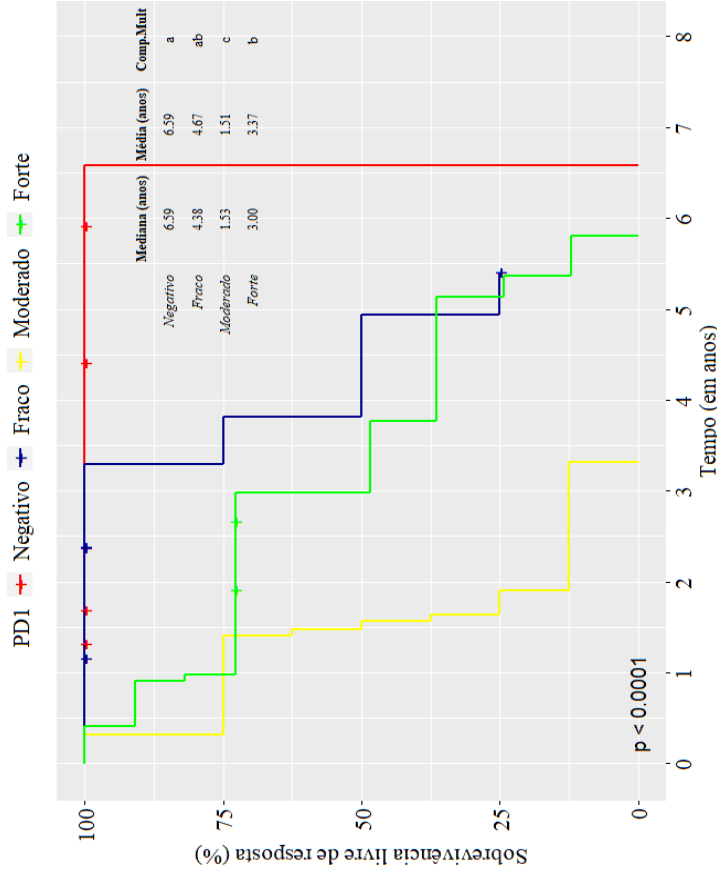


Fonte: Autoria própria

Nota: A relação de sobrevida e expressão do PD-L1 proposto para 5 anos se considera melhor tempo sem eventos a expressão fraca ainda assim os que apresentam a expressão negativa apresentaram menor tempo geral mais esse tempo foi constante o seja menor quantidade de eventos. O valor de p não foi significativo em relação a expressão com PD-L1 (p 0,41).

Dados: Foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos.

Gráfico 7 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-1 (até 10 anos).

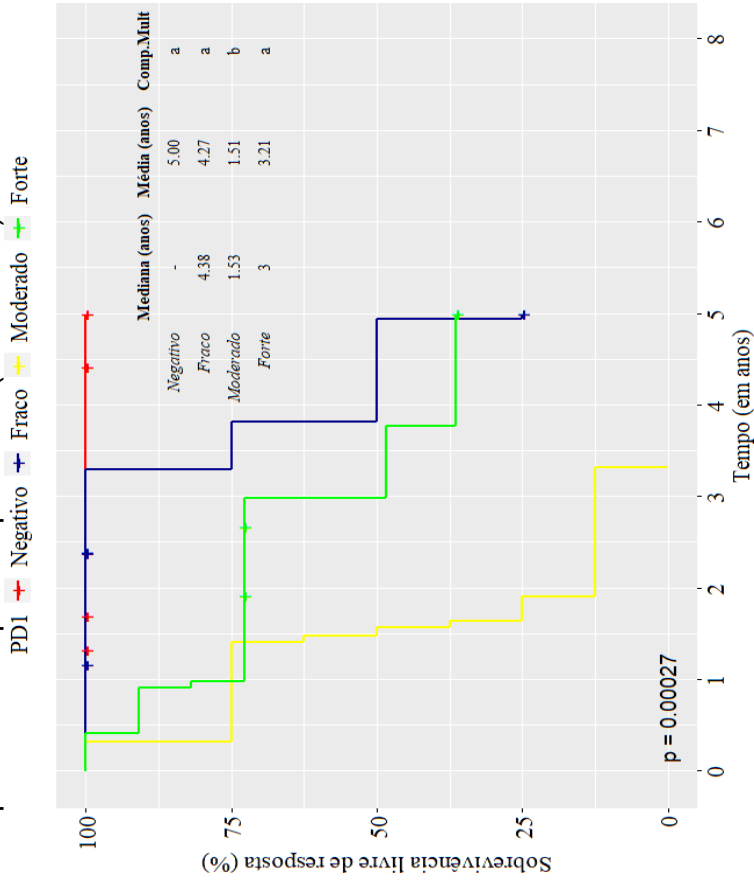


Fonte: Autoria própria

Nota: a relação de sobrevida e a expressão do PD-1 proposto para 10 anos para as expressões negativa e fraca foram as melhores com sobrevida geral livre de eventos neste caso particular, sendo os que apresentaram PD-1 negativo obtiveram melhores resultados (no grupo dos PD-1 negativos tem um óbito) a segunda de melhor tempo e constante foi fraco e se comprova que tem relação estatisticamente positiva com o $p < 0,0001$ a relação de SLE e PD1.

Dados: foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos.

Gráfico 8 - Curva de sobrevida livre de eventos de Kaplan-Meier dos pacientes separado por PD-1 (até 5 anos).

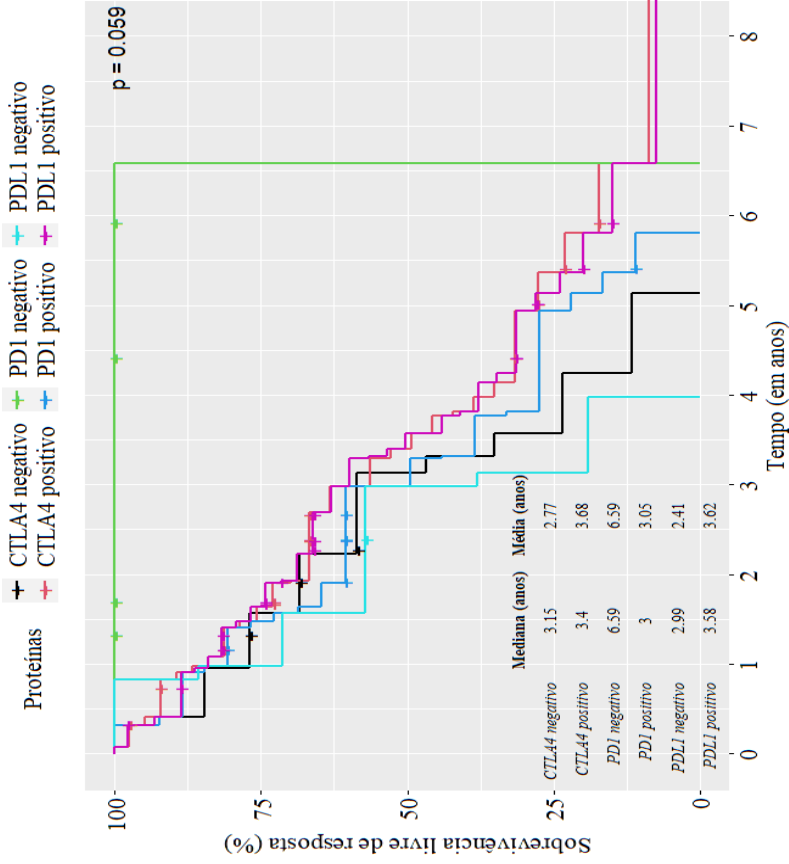


Fonte: Autoria própria

Nota: A relação de sobrevida e a expressão do PD-1 proposto para 5 anos para os que expressaram negativo para PD-1 foram os de melhor SLE constante, seguido de expressão fraca comprovando-se também que sim existe uma relação estatisticamente significativa com o valor de $p 0,00027$.

Dados: foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos.

Gráfico 9 - Curva de sobrevida livre de progressão de Kaplan-Meier dos pacientes separados por CTLA-4, PD-L1 e PD-L1 e PD-1 (até 10 anos).

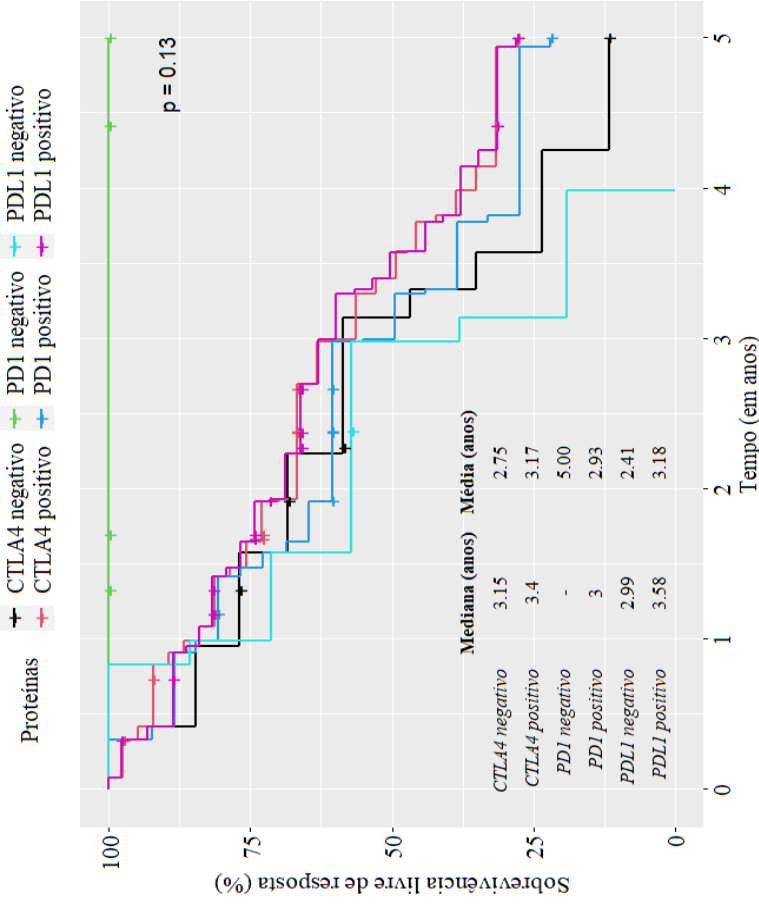


Fonte: Autoria própria

Nota: A SLE em relação das expressões CTLA-4, PD-L1 e PD-1 na comparação para 10 anos a expressão das três proteínas, as que apresentaram maior tempo de sobrevida e livre de eventos foram o grupo PD-1 e as que expressaram CTLA-4 negativo, mesmo assim, não foi encontrada relação estatisticamente positiva com $p > 0,05$.

Dados: foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos.

Gráfico 10 - Curva de sobrevida livre de progressão de Kaplan-Meier dos pacientes separado por CTLA-4, PD-L1 e PD-1 (até 5 anos).



Fonte: Autoria própria

Nota: A SLE em relação das expressões CTLA-4, PD-L1 e PD-1 na comparação para 5 anos a expressão das três proteínas, as expressões em conjunto relacionadas a SLE sempre se mantêm os mesmos resultados o PD-1 negativo e do melhor prognóstico na sobrevida ainda assim não existe uma relação significativa ($p > 0,05$).

Dados: foi utilizado o método de Kaplan-Meier, o teste log-rank é um teste não paramétrico utilizado na comparação de curvas de sobrevida entre dois ou mais grupos.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos uma maior frequência de pacientes com idade <29 anos, com maioria do sexo feminino. De acordo com o sexo, tal percentual coincide com o encontrado em CAMUS, V. e colaboradores (2023) onde o sexo feminino foi predominante e diverge da maioria dos estudos publicados onde o sexo masculino é o mais prevalente em porcentagem (“Hodgkin Lymphoma: Relapsed/Refractory”, 2023). Estudos feitos no Brasil, como SILVA TENORIO e colaboradores (2019), apresentam que 69,4% dos pacientes com LH são do sexo masculino. No estudo de MONTEIRO e colaboradores (2016), a idade média dos pacientes com LH foi de 28,3 anos e, destes, o sexo masculino teve maior porcentagem com 64,6%. No estudo brasileiro de Pitombeira e colaboradores (1980), encontrou predominância masculina, com idade média predominante de 31 anos, coincidindo com este estudo brasileiro onde a idade predominante foi de até 29 anos. No estudo de Almeida e colaboradores (2020) em São Paulo, Brasil, a maioria dos pacientes com LH foi o sexo feminino corroborando com o presente estudo. O fato da maioria dos participantes serem do sexo feminino pode ser atribuído ao predomínio feminino na população brasileira de acordo com senso demográfico de 2022 (IBGE, 2022).

O estágio clínico mais prevalente foi o estágio II, seguido do estágio III, quanto ao tipo de sintomatologia mais prevalente foi o tipo B e quanto a prevalência de LHc a maioria dos pacientes eram do tipo esclerose nodular e celularidade mista. No estudo de ALMEIDA (2020), com 41 pacientes com LH, observou-se que no estadiamento, a maioria dos pacientes 52,5% tinham estágio III e IV e 47,5% apresentaram estágio I e II. O presente estudo, corrobora com o estadiamento encontrado por Pitombeira (1980) onde foi observado que a maioria dos pacientes tinham estágio do tipo II: 37,7% com predomínio cervical (53,7%). De acordo com Leukemia & Lymphoma society (2014), o subtipo mais frequente no LH é esclerose nodular (EN) representando 60-70% dos casos de LH, sendo o mais comum nos adultos jovens em idades 15 aos 34 anos. Além disso, o gânglio acometido mais comum é o mediastino e o segundo subtipo de LH mais comum é o de celularidade mista (CM) que fica entre o 25% em adultos maiores e adolescentes.

Em relação ao tratamento de primeira linha, no presente estudo a maioria dos pacientes foram submetidos a 6 ciclos de ABVD. A primeira resposta ao tratamento foi: resposta completa e a segunda resposta ao tratamento, a maioria dos pacientes obteve

resposta completa. No estudo de Almeida (2020), os pacientes fizeram em média de 4 a 8 ciclos de ABVD com 66% dos pacientes com resposta completa, corroborando com os achados do presente estudo. Bröckelmann e colaboradores (2018), expressam que desde que a poliquimioterapia não seja contraindicada, estes pacientes devem ser tratados com dois ciclos de ABVD seguidos de quatro a seis ciclos de AVD (doxorubicina, vinblastina e dacarbazina) e tratamento local de linfomas residuais. Cabrera e colaboradores (2019) relata que pacientes tratados com ABVD em estágios localizados melhoraram de 85% para 91,7%.

O IPS dos pacientes estava em maior percentual com bom prognóstico nos valores 2 e 3. Observamos ainda, uma baixa taxa de óbitos.. ALESSIA BARI (2020), avaliou a significância prognóstica do IPS em 520 pacientes com LH em estágio avançado no estudo guiado por PET, foram encontradas pontuações do IPS mais prevalentes no IPS 2 e 3 corroborando com os achados do presente estudo; CAMUS, V. e colaboradores (2023) no estudo com um N:120 encontrou da mesma forma, foi encontrada semelhança com baixas pontuações. O IPS mantém sua capacidade prognóstica em estágios iniciais e precisa em pacientes com LH avançados. Obtivemos os os resultados do IPS de forma consideravelmente reduzida, fato que provavelmente está relacionado à melhora nos desfechos de sobrevida em pacientes de alto risco.

O percentual de recidiva foi de 19,23%. Do grupo de pacientes do estudo em refratariedade 26,92% pacientes foram submetidos ao transplante. No estudo de Giesta (2012), a recidiva foi de 9,27% dos pacientes com LH que atingiram resposta completa. Dos pacientes que apresentaram recidiva no presente estudo, 40% deles apresentaram recidiva no período de 1 a 2 anos. No LHc, as recidivas ocorrem na maioria dos casos nos primeiros três anos após o diagnóstico. Para os pacientes que recidivam ou são refratários, as terapias secundárias são eficazes em proporcionar outra remissão ou a cura a doença. Dentre as opções de tratamentos disponíveis para pacientes com LH recidivante ou refratário existe a terapia combinada, seguida de transplante autólogo de células-tronco. A radioterapia no local envolvido também pode ser usada (“Hodgkin Lymphoma: Relapsed/Refractory”, 2023).

No presente estudo observamos elevada expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA-4 nas biopsias de linfonodo de pacientes com LH por imunohistoquímica. No estudo

de Gren e colaboradores (2010) observa-se uma alta expressão de PD-L1 / PD-L2 em célula Reed Stenberg (RS) em LHc (De Re et al., 2019). Tal achado pode ser justificado pelo ambiente inflamatório que está associado a origem das RS derivadas do centro germinativo, no qual microambiente tumoral cHL (TME) favorece a expressão de PD-L1 nas células RS positivas e macrófagos associados a tumores (TAMs) e a expressão de PD-L1 e CTLA-4 nas células T para suprimir a imunidade antitumoral (Patel et al., 2019).

Analisando a expressão das proteínas, quanto a intensidade observamos aumento da expressão da proteína PD-1 tanto em intensidade forte como moderada na maioria dos casos. No estudo de Artem e colaboradores, (2021) observou-se uma menor expressão positivas de PD-1 em 68 pacientes com LH, principalmente com intensidades com intensidade de expressão fraca ou moderada. No estudo de Taylor et al., 2023, a expressão de PD1 foi heterogênea entre os casos, com padrões variando de ausência de marcação a marcação fraca, sendo observado uma baixo perfil de expressão de PD-1 em células CD3, CD4 e CD8 em pacientes com LHc. No estudo de HOLLANDER e colaboradores (2018), 50% dos pacientes com LHc apresentaram expressão de PD-1 de intensidade fraca. Contudo, a expressão a expressão heterogênea de PD-1 deve-se a fatores individuais do paciente, bem como a fatores de regulação da expressão da proteína e a infiltração de tumores por células T (Hollander et al., 2018).

A expressão de PD-L1 também a maioria obteve maior classificação quanto a intensidade em forte e moderada. No estudo de HOLLANDER e colaboradores (2018), a expressão de PD-L1 em biópsia de linfonodo de pacientes recidivantes de LH apresentaram alta expressão de PD-L1 em 73% dos pacientes ao diagnóstico por imunohistoquímica. As células RS no LHc expressam altos níveis de ligante 1 para PD1 (PDL1) por ativação devido a estado inflamatório com ativação do gene do locus *PDL1* em mais de 95% dos casos. A expressão de PDL1 é heterogênea também é proeminente em outras células do microambiente tumoral essa heterogeneidade na expressão deve-se a processos biológicos, como a regulação de expressão dessa proteína nos níveis de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução, além de estímulos inflamatórios, ativação de vias oncogênicas (Lee et al., 2022; Yi et al., 2021). Diferentemente do PD-1 e PD-L1, o CTLA-4 foi predominantemente fraco na maioria dos pacientes. No estudo de He (2020) também foi observada uma expressão baixa expressão de CTLA-4 no em pacientes com

LHH. Observamos diferentes padrões de marcação do CTLA-4 pontos focais ou padrões dispersos com marcação: apenas no citoplasma, no citoplasma/membrana ou marcando completamente a célula citoplasma/membrana/núcleo. Essa variação de marcação deve-se a infiltração de células T no local do tumor e fatores individuais do paciente.

Na etapa de associação das proteínas CTLA-4, PD-L1 e PD-1, não houve significância estatística em relação às características sociodemográficas. Com relação às características clínicas em associação com proteínas, não houve significância estatística, exceto para pacientes com mediastino positivo na análise da proteína CTLA-4. No estudo de He (2020) foi observado associação entre a expressão positiva do CTLA-4 e linfócitos infiltradores de tumor (TILs) e com o prognóstico. No estudo, Mazzaschi (2018) a expressão alta PD-L1 em linfócitos citotóxicos CD8, apresentou associação com o status nodular, pois os tumores nodulares iniciais tiveram uma pontuação PD-L1, duas vezes maior ($P < 0,001$) em comparação com o nodular no grau 2.

No presente estudo observamos associação entre o uso exclusivo do ABVD com a proteína PD-L1 de maneira significativa. Os dois principais regimes de quimioterapia no LH incluem (1) adriamicina (A), bleomicina (B), vinblastina (V) e dacarbazina (D) (ABVD) ou uso de bleomicina, etoposídeo, adriamicina, ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona (BEACOPP). De acordo com o estudo de Meti e colaboradores (2018), o uso dos inibidores de PD-1 resultaram numa Resposta completa ligeiramente inferior e mais duradoura quando comparados com os pacientes que faziam uso exclusivo de ABVD, sugerindo que o uso combinado das duas terapias podem favorecer ainda mais na resposta completa dos pacientes com LH.

A associação entre PD-1 e primeira resposta foi estatisticamente significativa ($p=0,042$), detectando que aquele com maior percentual que poderia ser influenciado e significativamente diferente foi RC (61,29%) para o PD-1 com expressão positiva. Assim como na associação com os pacientes que realizaram uma segunda terapia, observamos uma relação estatisticamente significativa ($p 0,008$) com aqueles que expressaram a associação com a proteína PD-1, sugerindo que mostram que aqueles que não foram submetidos a uma segunda terapia apresentam maior proporção de pacientes com expressão de PD-1. Por outro lado, na segunda resposta, os pacientes com amostras com segunda resposta associada à expressão de CTLA-4 foram significativos ($p 0,023$),

influenciando principalmente os pacientes com resposta completa (59,62%) seguida de resposta parcial (13,46%).

A associação da expressão proteica e esta última condição foi estatisticamente significativa em relação ao CTLA-4 (p 0,045), o de maior porcentagem com positividade em CTLA-4 foi RC (67,31%). Embora o IPS dos pacientes tenha um bom prognóstico e altas porcentagens, não foi obtida relação estatisticamente significativa com a expressão das proteínas e o prognóstico do paciente.

A sobrevida livre de eventos (SLE) foi considerada como o primeiro evento de resposta do paciente e resultou em 3,45 anos, utilizando um período gráfico de 10 anos. E em um período de 5 anos, resultou um SLE de 3,07 anos, levando em consideração que o evento considerado foi qualquer evento desde o início do tratamento até a primeira complicação leve ou crítica relatada na história clínica. Observamos associação entre a expressão entre a expressão positiva da proteína PD-1 de intensidade moderada com menor SLE. No estudo de Koh e colaboradores (2019), a expressão da proteína PD-1 no microambiente peritumoral foi associado à baixa sobrevida global (SG), considerando proteína PD-1 como um fator prognóstico independente para sobrevida dos pacientes com LH. CAMUS, V. e colaboradores (2023) encontrou que na análise multivariada, o status elevado de PD-L1/PD-L2 foi um preditor independente de resultados adversos. No presente estudo não observamos associação entre PD-L1 e CTLA4 com a SLE. Koh e colaboradores (2019), também não encontrou associação do PDL1 com a sobrevida, assim como no estudo KUBES e colaboradores (2023) onde a expressão positiva de PD-L1 em pacientes com LH também não apresentou diferença significativa entre pacientes com recidiva e pacientes sem recidiva quanto a análise de SLE. No estudo de Mazzaschi (2018), o PD-L1 também não apresentou associação estatisticamente significativo na sobrevida corroborando com os resultados do presente estudo.

A expressão das três proteínas juntas não apresentou associação com a menor SLE. No estudo de He (2020) sobre a análise da sobrevida demonstrou que a expressão de CTLA-4 no tumor foi significativamente associada a um SLE. A alta expressão de CTLA-4 em células tumorais e TILs está fortemente associada a um mau prognóstico. No entanto, não observamos tal associação.

Diante disso, o presente estudo ressalta a importância de identificar a expressão

dos receptores PD-1, PD-L1 e CTLA4 como potencial biomarcador no LH para o tratamento e avaliação do prognóstico (Barreyro et al., 2018). CAMUS, V. e colaboradores (2023) expressa que alta expressão do gene PDL1/PDL2 define uma população com forte privilégio imunológico e piores resultados da quimioterapia padrão que poderia se beneficiar da terapia de primeira linha com inibidores de checkpoint.

As limitações deste estudo incluem marcações inespecíficas dificultando a padronização e análise por IHQ, além do grau variável e subjetivo de intensidade de marcação das proteínas que fizeram necessário adaptar um score de positividade para melhor análise das expressões. Além disso, obtivemos dificuldade em obter amostras com material suficiente para as análises sugerindo um número amostral maior de pacientes com LH para confirmar os achados do presente estudo.

Nesse contexto podemos inferir que a análise da expressão proteica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 foram expressivas no LHc ao diagnóstico e associaram com variáveis clínicas e com o prognóstico. Resultados esses que ressaltam o uso da expressão dessas proteínas no direcionamento da imunoterapia.

8 CONCLUSÕES

- A expressão proteica de PD-1, PD-L1 e CTLA4 revelou-se elevada em pacientes com LHc ao diagnóstico .
- Não se observou associação entre expressão das proteínas PD-1, PD-L1 e CTLA4 e o sexo e a idade dos pacientes com LHc.
- A expressão proteica aumentada de PD-1 mostrou associação com a resposta completa ao primeiro tratamento com a não necessidade de segunda terapia. A expressão positiva de PD-L1 associou com o uso exclusivo de ABVD e a expressão positiva de CTLA4 associou com o não comprometimento do mediastino, com a resposta completa ao segundo tratamento e com a resposta completa na condição final do paciente com LH.
- A expressão positiva de PD-1 com intensidade moderada de marcação associou com menor sobrevida livre de progressão (SLE).
- Além disso, a expressão de PD-1, PD-L1 e CTLA-4 não conferiu associação com a menor sobrevida global (SG).
- Com estes resultados podemos deixar aberta a possibilidade de sugerir a análise de CTLA-4 e PD-L1 como prognóstico no LHc.

REFERÊNCIAS

- ADM-AGUARDIOLA. PD-1 (Programed death-1, CD279).** Disponível em: <<https://www.histopat.es/2018/09/pd-1-programed-death-1-cd279/>>. Acesso em: 6 dez. 2022.
- AL HADIDI, S. A.; LEE, H. J. Pembrolizumab for the treatment of Hodgkin Lymphoma. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1275–1282, 16 out. 2020.
- ALAUSA, M. et al. Refractory acute kidney transplant rejection with CD20 graft infiltrates and successful therapy with rituximab. **Clinical Transplantation**, v. 19, n. 1, p. 137–140, 1 fev. 2005.
- ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação de Taxa de Resposta Completa Em Pacientes Portadores de Linfoma de Hodgkin Clássico ao Término do Tratamento de Primeira Linha Baseado em Score Prognóstico e PET (Positron Emission Tomography) Interim: Análise De Uma Instituição Privada. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, p. 202–203, nov. 2020.
- ALMEIDA, J. M. M. F. et al. Células dendríticas foliculares: imunofenotipagem no linfoma de Hodgkin clássico esclerose nodular. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 1, mar. 2006.
- AMIN, M. B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93–99, 17 jan. 2017.
- Annual Report 2020 | Leukemia and Lymphoma Society.** Disponível em: <<https://www.lls.org/annual-report>>.
- ANSELL, S. M. Hodgkin lymphoma: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology**, 19 set. 2022.
- ARTEM, G. et al. Immunosuppressive Microenvironment and Efficacy of PD-1 Inhibitors in Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma: Checkpoint Molecules Landscape and Macrophage Populations. **Cancers**, v. 13, n. 22, p. 5676–5676, 12 nov. 2021.
- ATANACKOVIC, D.; LUETKENS, T. Biomarkers for checkpoint inhibition in hematologic malignancies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 52, p. 198–206, out. 2018.
- BAIYEE, D.; WARNKE, R.; NATKUNAM, Y. Lack of Utility of CD20 Immunohistochemistry in Staging Bone Marrow Biopsies for Diffuse Large B-cell Lymphoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 17, n. 2, p. 93–95, mar. 2009.
- BARBERY GÓMEZ B, C.; PAULSON VERNAZA, G.; ENCALADA ORELLANA, J.. Linfoma no hodkin en pacientes pediátricos. **Oncol.(Quito)**, p. 29-37, 1994.

BENNETT, R. L.; LICHT, J. D. Targeting Epigenetics in Cancer. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 58, n. 1, p. 187–207, 6 jan. 2018.

BRECCIA, M. et al. Aberrant phenotypic expression of CD15 and CD56 identifies poor prognostic acute promyelocytic leukemia patients. **Leukemia Research**, v. 38, n. 2, p. 194–197, fev. 2014.

BRICE P, DE KERVILER, E., FRIEDBERG, J.W.. Classical Hodgkin lymphoma. **Lancet**, v.23, n. 398(10310), p.1518-1527, 2021.

BRÖCKELMANN, P. J. et al. Hodgkin Lymphoma in Adults. **Deutsches Aerzteblatt Online**, 6 ago. 2018.

BUCHBINDER, E. I.; DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 1, p. 98–106, fev. 2016.

BUGLIONE, M. et al. A Systematic Review on Intensity Modulated Radiation Therapy for Mediastinal Hodgkin's Lymphoma. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 167, p. 103437, 1 nov. 2021.

CABRERA C. , M. E. et al. Treatment of Hodgkin lymphoma. Analysis of 915 patients. **Revista médica de Chile**, v. 147, n. 4, p. 437–443, 1 abr. 2019.

CALADO, M.L. **Avaliação da expressão de proteínas citolíticas e moléculas inibitórias na regulação da atividade citotóxica em pacientes com linfoma não-Hodgkin e mieloma múltiplo**. 2019. 79f . Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Belo Horizonte, 2019.

CARBALLO, F. et al. Linfoma de Hodgkin con depleción linfocítica e infiltración difusa de médula ósea. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 72, n. 2, p. 137–140, 1 abr. 2011.

CAMUS, V. et al. High PDL1/PDL2 gene expression correlates with worse outcome in primary mediastinal large B-cell lymphoma. **Blood advances**, v. 7, n. 23, p. 7331–7345, 2023.

CERCHIONE, C. et al. Pegfilgrastim in Supportive Care of Hodgkin Lymphoma. **Cancers**, v. 14, n. 17, p. 4063, 23 ago. 2022

CHEN, C. et al. Association of Single-Nucleotide Variants in the Human Leukocyte Antigen and Other Loci With Childhood Hodgkin Lymphoma. **JAMA network open**, v. 5, n. 8, p. e2225647–e2225647, 8 ago. 2022.

CHEN, L.; HAN, X. Anti–PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present, and future. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 9, p. 3384–3391, 1 set. 2015.

CLARA, J. A. et al. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells—A clinical update. **Nature reviews clinical oncology**, v. 17, n. 4, p. 204-232, 2020.

CONNORS, J. M. et al. Hodgkin lymphoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 1–25, 23 jul. 2020.

CORTEZ, A. J. P. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in classical Hodgkin's lymphoma. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 33, n. 1, p. 10–14, 2011.

COZZOLINO, I. et al. CD15, CD30, and PAX5 evaluation in Hodgkin's lymphoma on fine-needle aspiration cytology samples. **Diagnostic Cytopathology**, v. 48, n. 3, p. 211–216, 11 dez. 2019.

DE RE et al. Classical Hodgkin's Lymphoma in the Era of Immune Checkpoint Inhibition. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1596, 2 out. 2019.

DELGADO, J. et al. Diagnostic Significance of CD20 and FMC7 Expression in B-Cell Disorders. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 120, n. 5, p. 754–759, nov. 2003.

DIX, G. et al. Evaluation of PD-L1 Expression in Tumor Tissue of Patients with Lung Carcinoma and Correlation with Clinical and Demographic Data. **Journal of immunology research**, v. 2016, p. 1–12, 1 jan. 2016.

DUNCAN, S. M.; SEIGEL, G. M. High-contrast enzymatic immunohistochemistry of pigmented tissues. **Journal of Biological Methods**, v. 3, n. 3, p. 47, 11 jul. 2016.

DZOBO, K. et al. Advances in Therapeutic Targeting of Cancer Stem Cells within the Tumor Microenvironment: **An Updated Review. Cells**, v. 9, n. 8, p. 1896, 13 ago. 2020.

ELY, A. et al. Orbital Involvement in Extranodal Natural Killer T Cell Lymphoma: An Atypical Case Presentation and Review of The Literature. **Orbit**, v. 31, n. 4, p. 267–269, 8 jun. 2012.

FLEMMING, A. PD1 makes waves in anticancer immunotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 8, p. 601–601, ago. 2012.

FLOROU, D. et al. Anti-CD20 Agents for Multiple Sclerosis: Spotlight on Ocrelizumab and Ofatumumab. **Brain Sciences**, v. 10, n. 10, p. 758, 20 out. 2020.

FROUIN, E., MARIE-LAURE JULLIÉ et al. CD20 Antigen May Be Expressed by Reactive or Lymphomatous Cells of Transformed Mycosis Fungoides. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 37, n. 12, p. 1845–1854, 1 dez. 2013.

GATALICA, Z. et al. PD-L1 and PD1 Expression in Lymphomas. **Blood**, v. 126, n. 23, p. 3899–3899, 3 dez. 2015.

GAUCHOTTE, G., et al., FVIIIra, CD15, and tryptase performance in the diagnosis of skin stab wound vitality in forensic pathology. **International Journal of Legal Medicine**, v. 127, n. 5, p. 957–965, 11 jun. 2013.

GIESTA, R. P. et al. Influência do CD 20 na refratariedade do linfoma de Hodgkin clássico ao tratamento inicial com o esquema ABVD, no Ceará, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 247–252, jun. 2009.

GIESTA, R.P.. **Estudo do Valor Preditivo e Prognóstico de Marcadores Imunológicos no Linfoma de Hodgkin Clássico, no Ceará – Brasil**. 2012. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, -Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia, Fortaleza, 2012.

GREAVES, P. et al. Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. **Blood**, v. 122, n. 16, p. 2856–2863, 17 out. 2013.

GRIMM, K. E.; BAKKE, A. C.; O'MALLEY, D. P. Abnormal Expression of CD20 on IgG4 Plasma Cells Associated With IgG4-Related Lymphadenopathy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, n. 9, p. 1282–1285, 1 set. 2013.

HASENCLEVER, D. et al. A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 21, p. 1506–1514, 19 nov. 1998.

HE, G. et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) expression in chordoma and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) predicts prognosis of spinal chordoma. **Clinical & Translational Oncology**, v. 22, n. 12, p. 2324–2332, 5 jun. 2020.

INCA. **ESTIMATIVA INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL: Biênio 2018-2019**.. Brasil, 2020.

INCA. **INFORMATIVO VIGILÂNCIA DO CÂNCER: Magnitude do câncer no brasil: incidência, mortalidade e tendências**. Brasil, 2020.

KASEB, H.; BABIKER, H. M. **Hodgkin lymphoma**. 2018.

KHAN, M. et al. A review of pathobiology and therapies for classic Hodgkin lymphoma. **Blood Reviews**, v. 55, p. 100949, set. 2022.

KOH Y. et al. Programmed death 1 expression in the peritumoral microenvironment is associated with a poorer prognosis in classical Hodgkin lymphoma. **Tumor Biology** 37 (6): 7507 - 7514 , 2019.

KUBES, V. et al. Prognostic Significance of Immune-checkpoint Molecule PD-L1 in Classical Hodgkin Lymphoma: A Clinicopathologic Study of 120 Cases. **In Vivo**, v. 37, n. 4, p. 1735–1742, 1 jul. 2023

KURUVILLA, J. et al. Pembrolizumab versus brentuximab vedotin in relapsed or refractory classical Hodgkin lymphoma (KEYNOTE-204): an interim analysis of a multicentre, randomised, open-label, phase 3 study. **The Lancet Oncology**, v. 22, n. 4, p. 512–524, abr. 2021.

LARA-TORRES, C.; ORTIZ-HIDALGO, C.. Diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico del linfoma de Hodgkin y su diagnóstico diferencial. **Patología Revista latinoamericana**, v. 47, n. 1, p. 35-45, 2009.

LEE, S.-H. et al. PD-L1 expression in megakaryocytes and its clinicopathological features in primary myelofibrosis patients. **The journal of pathology**, v. 8, n. 1, p. 78–87, 4 set. 2021.

LEUKEMIA & LIMPHOMA SOCIETY., Linfoma de Hodgkin (Libro). Pàg 10., Disponible em: www.LLS.org/materiales.https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/sp_hodgkinlymphoma.pdf

LEUKEMIA & LIMPHOMA SOCIETY., Linfoma de Hodgkin (Libro). Pàg 15., Disponible em: www.LLS.org/materiales.https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/sp_hodgkinlymphoma.pdf

LI, H. et al. The CD20 Calcium Channel Is Localized to Microvilli and Constitutively Associated with Membrane Rafts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 19893–19901, 1 maio 2004.

LONGO, D. L.; ARMITAGE, J. O. A Better Treatment for Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma? **The New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 4, p. 370–372, 28 jul. 2022.

LONGO, D. L.; ARMITAGE, J. O. A Better Treatment for Advanced-Stage Hodgkin's Lymphoma? **The New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 4, p. 370–372, 28 jul. 2022.

LYMPHOMA RESEARCH FOUNDATION. **Hodgkin Lymphoma: Relapsed/Refractory**. 2023. Disponible em: <https://lymphoma.org/understanding-lymphoma/aboutlymphoma/hl/relapsedhl/>.

MA, Y et al. Polymorphisms of co-inhibitory molecules (CTLA-4/PD-1/PD-L1) and the risk of non-small cell lung cancer in a Chinese population. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 9, p. 16585, 2015.

MA, Y. et al. Circulating tumor DNA in Hodgkin lymphoma. **Annals of Hematology**, v. 101, n. 11, p. 2393–2403, 8 set. 2022.

MAESHIMA, A.M. et al. Follow-up Data of 10 Patients With B-cell Non-Hodgkin Lymphoma With a CD20-negative Phenotypic Change After Rituximab-containing Therapy. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 37, n. 4, p. 563–570, 1 abr.

2013.

MANDAL, A.. **Prognóstico do linfoma de Hodgkin**, 2019, News-Medical. Disponível em: <https://www.news-medical.net/health/Hodgkins-Lymphoma-Prognosis.aspx>. Acesso em: 08 de junho de 2021.

MARTIN, P.; LEONARD, J. P. **Linfoma de Hodgkin**. 2022. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/es/professional/hematolog%C3%ADa-y-oncolog%C3%ADa/linfomas/linfoma-de-hodgkin>

MAZZARELLA, L. et al. The evolving landscape of “next-generation” immune checkpoint inhibitors: A review. **European Journal of Cancer**, v. 117, p. 14–31, ago. 2019.

MAZZASCHI, G et al. Low PD-1 expression in cytotoxic CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes confers an immune-privileged tissue microenvironment in NSCLC with a prognostic and predictive value. **Clinical cancer research**, v. 24, n. 2, p. 407-419, 2018.

MENÉNDEZ, B. C. Linfoma Hodgkin. **Rev. Esp. Patol**, v.37, n.2, p.129-138. 2004.

MESQUITA, J. L. **Linfoma de Hodgkin Clássico: perfil de duas décadas de um serviço de referência em Fortaleza-Ceará**. 2020. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

METI, N.; ESFAHANI, K.; JOHNSON, N. A. The Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Classical Hodgkin Lymphoma. **Cancers**, v. 10, n. 6, 15 jun. 2018

MEYER, R. M.; AMBINDER, R. F.; STROOBANTS, S. Hodgkin's Lymphoma: Evolving Concepts with Implications for Practice. **Hematology**, v. 2004, n. 1, p. 184–202, 1 jan. 2004.

MOMOTOW, J. et al. Hodgkin Lymphoma—Review on Pathogenesis, Diagnosis, Current and Future Treatment Approaches for Adult Patients. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 5, p. 1125, 8 mar. 2021.

MONTANARI, F.; DIEFENBACH, C. Relapsed Hodgkin Lymphoma: Management Strategies. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 9, n. 3, p. 284–293, 19 jun. 2014.

MONTEIRO, T. A. F. et al. Linfoma de Hodgkin: aspectos epidemiológicos e subtipos diagnosticados em um hospital de referência no Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 1, p. 27–31, mar. 2016.

MULLARD, A. New checkpoint inhibitors ride the immunotherapy tsunami. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 7, p. 489–492, 1 jul. 2013.

NAVARRO TREVISÁN, N. P. et al. Detección inmunohistoquímica del virus de Epstein-

Barr en pacientes con linfoma. **Anales de la Facultad de Ciencias Médicas** (Asunción), v. 46, n. 2, p. 25–34, 1 dez. 2013.

PALUCH, C. et al. Immune Checkpoints as Therapeutic Targets in Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2306, 8 out. 2018.

PATEL, S.S. et al. The microenvironmental niche in classic Hodgkin lymphoma is enriched for CTLA-4–positive T cells that are PD-1–negative. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 134, n. 23, p. 2059-2069, 2019.

PEREZ-ZUNIGA, J. M. et al. Linfoma de Hodgkin. **Revista de Hematologia**, v. 20, n. 2, p. 124–130, 9 jul. 2019.

PFISTER, S. X.; ASHWORTH, A.. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 4, p. 241-263, 2017.

PIERCE, J.M.R.; MEHTA, A. Diagnostic, prognostic and therapeutic role of CD30 in lymphoma. **Expert review of hematology**, v. 10, n. 1, p. 29-37, 2017.

PINOCHET, P. et al. Prognostic value of baseline metabolic tumour volume in advanced-stage Hodgkin’s lymphoma. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.

PITOMBEIRA, M.S. **Doença de Hodgkin: análise de uma experiência**. 1980. 179 f. Tese (Concurso Professor Titular) - Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1980. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/74236>.

PRACCHIA, L. F. et al. Significado prognóstico dos graus histológicos do linfoma de Hodgkin do tipo esclerose nodular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 5, out. 2005.

QUIÑONES ÁVILA, M. DEL P.; PALOMINO PORTILLA, E. A.; YÁBAR BERROCAL, H. A. Classic Hodgkin Lymphoma At The Edgardo Rebagliati Martins National Hospital During 2015 To 2019. **Revista de la Facultad de Medicina Humana**, v. 21, n. 3, p. 502–509, 18 jun. 2021.

RABELO, Diogo Henrique. **Perfil clínico e sobrevida de pacientes acometidos pelo Linfoma de Hodgkin clássico: um estudo retrospectivo**. 2022. 84 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas)- Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022.

RAMOS, C. A. et al. Anti-CD30 CAR-T Cell Therapy in Relapsed and Refractory Hodgkin Lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 32, p. 3794–3804, 10 nov. 2020.

RAVIKUMAR, G. et al. CD15 as a marker of fetoplacental endothelial immaturity in IUGR placentas. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 32, n. 10, p. 1646–1653, 17 dez. 2017.

- REIS, A. P. DOS; MACHADO, J. A. N. Immunotherapy and immune checkpoint inhibitors in cancer. **Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia**, v. 4, n. 1, 2020.
- ROEMER, M. G. M. et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 23, p. 2690–2697, 10 ago. 2016.
- RONCADOR, G. et al. Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. **Haematologica**, v. 92, n. 8, p. 1059–1066, 1 ago. 2007.
- RONCADOR, G. **From antibodies to diagnosis: FOXP3 and PD-1 markers of human lymphoid malignancies**. 2012. 25 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências de La Vida, Universidad Autónoma de Madrid, Espanha, 2012.
- ROWSHANRAVAN, B.; HALLIDAY, N.; SANSOM, D. M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. **Blood**, v. 131, n. 1, p. 58–67, 4 jan. 2018.
- SÁ MACHADO, Ana Catarina et al. **LINFOMA DE HODGKIN BIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO**. Disponível em: <https://docplayer.com.br/42835490-Linfoma-de-hodgkin-biologia-diagnostico-e-%20tratamento.html>. Acesso em: 25 jun. 2019.
- SANTOS DOS REIS, G. **Expressão de moléculas citotóxicas em células neoplásicas do Linfoma de Hodgkin: uma revisão sistemática**. 2013. TCC (Graduação) - Curso de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- SANTOS, M. A. O.; LIMA, M. DE M. CD20 role in pathophysiology of Hodgkin's disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 9, p. 810–813, 2017
- SATOU, A.; TAKAHARA, T.; NAKAMURA, S. An Update on the Pathology and Molecular Features of Hodgkin Lymphoma. **Cancers**, v. 14, n. 11, p. 2647, 26 maio 2022.
- SEIGEL, G. M. et al. HER2/ERBB2 immunoreactivity in human retinoblastoma. **Tumor Biology**, v. 37, n. 5, p. 6135–6142, 27 nov. 2015.
- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. Dissecting the mechanisms of immune checkpoint therapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 2, p. 75–76, 10 jan. 2020.
- SHARMA, P.; ALLISON, J. P. The future of immune checkpoint therapy. **Science**, v. 348, n. 6230, p. 56–61, 2 abr. 2015.
- SHIMASAKI, N.; JAIN, A.; CAMPANA, D. NK cells for cancer immunotherapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, 6 jan. 2020.
- SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72,

n. 1, p. 7-33, 2022.

SOBHANI, N. et al. CTLA-4 in Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1440, 22 mar. 2021.

SOUZA, R.S. **Identificação de biomarcadores lipídicos em tumores mamários e correlação com IL-17 como fator inflamatório**. 2022. 113 f. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus (AM), 2021.

SPECTOR, N. Linfoma de Hodgkin: aspectos atuais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 3-6, 2009.

SUNSHINE, J.; TAUBE, J. M. PD-1/PD-L1 inhibitors. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 23, p. 32–38, ago. 2015.

TAKAHARA, T. et al. Hodgkin Lymphoma: Biology and Differential Diagnostic Problem. **Diagnostics**, v. 12, n. 6, p. 1507, 20 jun. 2022.

TAMAYO, P. et al. 18F-FDG PET/TC en el manejo clínico de los linfomas. **Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular**, v. 36, n. 5, p. 312–321, 1 set. 2017

TANAKA, Y. et al. Expression pattern of PD-L1 and PD-L2 in classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma, and gray zone lymphoma. **European Journal of Haematology**, v. 100, n. 5, p. 511–517, 1 mar. 2018.

TAVARES, M. C.. **Caracterização do infiltrado inflamatório e associação com expressão de proteica de PD-1, PD-L1 e PD-L2 e sobrevida em carcinoma mamário triplo-negativo**. 2018. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Fundação Antônio Prudente., São Paulo, 2018.

TEIXEIRA, H. C. et al. Proteínas de checkpoint imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura. **HU Revista**, v. 45, n. 3, p. 325–333, 28 nov. 2019.

TENG, M. W. L., et al. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 13, n. 3, p. 143-158, 2016.

TENÓRIO, T. B. S. et al. Impacto da expressão de ebv, pd-1 e pd-l1 na sobrevida global e livre de eventos em pacientes infanto-juvenis com linfoma de hodgkin de centro de referência em oncologia em Recife (Brasil). **higia.imip.org.br**, 2019. acesso: 10 julho 2021

TOWNSEND, W.; LINCH, D. Hodgkin's lymphoma in adults. **The Lancet**, v. 380, n. 9844, p. 836–847, set. 2012.

VALIPOUR, B. et al. NK cells: An attractive candidate for cancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 19352–19365, 1 nov. 2019

VILLA ROBLES, M.R. et al., Expresión del ligando de proteína de muerte programada 1 (PD-L1) en linfoma de Hodgkin en pacientes peruanos. **Horizonte Médico (Lima)**, v. 22, n. 3, p. 1927, 27 set. 2022.

WEBB, J. R. et al. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 141, n. 2, p. 293–302, maio 2016.

WEI, S. C., DUFFY, C. R., & ALLISON, J. P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. **Cancer discovery**, 2018.

WU, D. et al. “Double-Hit” Mature B-Cell Lymphomas Show a Common Immunophenotype by Flow Cytometry That Includes Decreased CD20 Expression. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 134, n. 2, p. 258–265, ago. 2010.

YI, M., NIU, M., XU, L. et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. **J Hematol Oncol**. N. 14, v. 10, 2021.

ZERDES, I. et al. Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations. **Oncogene**, v. 37, n. 34, p. 4639–4661, 1 ago. 2018.

ZHANG, M. et al. PD-L1/PD-1 axis serves an important role in natural killer cell-induced cytotoxicity in osteosarcoma. **Oncology Reports**, 3 set. 2019.

ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. **Oncolimmunology**, v. 1, n. 8, p. 1223–1225, nov. 2012.