

Investigação da infecção por Epstein Barr vírus (EBV) e associação com o perfil epidemiológico, clínico e citogenético de pacientes portadores de leucemia linfocítica crônica (LLC)

Investigation of Epstein Barr virus (EBV) infection and association with the epidemiological, clinical and cytogenetic profile of patients with chronic lymphocytic leukemia (LLC)

DOI:10.34117/bjdv8n5-103

Recebimento dos originais: 21/03/2022

Aceitação para publicação: 29/04/2022

Camile Irene Mota da Silva

Mestra em Biologia Parasitária na Amazônia pela Universidade do Estado do Pará
UEPA

Instituição: Universidade do Estado do Pará - UEPA

Endereço: Tv. Perebebuí, nº2623 - Marco, CEP: 66087-662 - Belém, PA, Brasil

E-mail: camilee.mota@gmail.com

Lucas da Silva Lopes

Graduando em Medicina pela Universidade do Estado do Pará – UEPA, campus Belém
Pará, Brasil

Instituição: Universidade do Estado do Pará - UEPA

Endereço: Tv. Perebebuí, nº2623 - Marco, CEP: 66087-662 - Belém, PA, Brasil

E-mail: luclopes.27@gmail.com

Natasha Melnik Gomes

Graduanda em Medicina pela Universidade do Estado do Pará – UEPA, campus Belém,
Pará, Brasil

Instituição: Universidade do Estado do Pará - UEPA

Endereço: Tv. Perebebuí, nº2623 - Marco, CEP: 66087-662 - Belém, PA Brasil

E-mail: natmelnikg@gmail.com

Gabriela Maria Coimbra Coelho de Assis

Graduação em Medicina

Instituição: Universidade do Estado do Pará - UEPA

Endereço: Tv. Perebebuí, nº2623 - Marco, CEP: 66087-662 - Belém, PA, Brasil

E-mail: gabrielainnefro@hotmail.com

Iran Barros Costa

Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pela Universidade Federal Do
Pará - UFPA

Instituição: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Seção de Virologia

Endereço: Rodovia BR-316 km 7 s/n - Levilândia – CEP: 67030-000 - Ananindeua
Pará - Brasil

E-mail: irancosta@iec.gov.br

Igor Brasil-Costa

Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituição: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Seção de Virologia
Endereço: Rodovia BR-316 km 7 s/n - Levilândia - CEP: 67030-000 - Ananindeua
Pará Brasil
E-mail: igorcosta@iec.gov.br

Patrícia Danielle Lima de Lima

Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Pará - UFPA
Instituição: Universidade do Estado do Pará - UEPA
Endereço: Tv. Perebebuí, nº2623 - Marco, CEP: 66087-662 - Belém, PA, Brasil
E-mail: patricia.lima@uepa.br

RESUMO

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma doença linfoproliferativa considerada a doença mais comum nos idosos no mundo ocidental. A citogenética é uma importante ferramenta prognóstica que demonstra as principais alterações cromossômicas predizendo o curso clínico da doença, a sobrevida do paciente e auxilia na escolha do tratamento. O vírus Epstein-Barr (EBV) é um γ ubíquo-herpesvírus que infecta mais de 90% da população mundial. A relação entre EBV e o curso clínico de pacientes com LLC é desconhecida. O objetivo desse trabalho é investigar a infecção do EBV em pacientes portadores de LLC. Foi realizado um estudo transversal de 46 pacientes sob diagnóstico de LLC e tratamento efetivado nos períodos de 2017 a 2019. Os dados foram obtidos pela revisão de prontuários médicos e registrados via formulário eletrônico com aspectos demográficos, clínicos, parâmetros hematológicos e perfil citogenético. Para a detecção do EBV foi utilizado o teste de reação em cadeia da polimerase (PCR). O DNA viral foi extraído com auxílio do kit "QIAamp DNA Mini" (QIAGEN) e submetido à reação de PCR, utilizando o kit comercial Ludwig Biotec, tendo como alvo o gene EBNA-3C. Observou-se que o sinal clínico mais frequente foi esplenomegalia e a linfocitose a alteração laboratorial de mau prognóstico. As alterações citogenéticas foram encontradas em 36,6% da população estuda e 16,67% foram de mau prognóstico (deleção 11q, 17p e tp53). Foram detectados 43,47% dos pacientes com DNA viral do EBV. Ocorrendo um aumento estatístico significativo de complicações e comorbidade e evoluções a óbito nos pacientes EBV positivo ($p < 0,03$ e $p < 0,025$, respectivamente). Houve correlação entre as alterações citogenéticas e a infecção por EBV ($p < 0,0001$). Observando que a maioria dos pacientes diagnosticados nesse estudo com as alterações citogenéticas de mau prognóstico apresentarem DNA viral detectável para EBV, sugerindo-se que a infecção por EBV possa piora o prognóstico nesses pacientes, causando uma sobrevida mais curta. A maioria dos achados deste estudo assemelha-se aos relatos da literatura, contudo, evidenciou-se a necessidade de estudos com maior casuística a fim de melhor esclarece a relação entre a infecção do EBV com a LLC.

Palavras-chave: leucemia linfocítica crônica, epstein-barr vírus, citogenética, ebv.

ABSTRAT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a lymphoproliferative disease considered the most common disease in the elderly in the Western world. Cytogenetics is an important prognostic tool that demonstrates the main chromosomal alterations predicting the clinical course of the disease, patient survival, and assists in the choice of treatment. Epstein-Barr virus (EBV) is a γ ubiquitous herpesvirus that infects more than 90% of the

world's population. The relationship between EBV and the clinical course of patients with LLC is unknown. The aim of this work is to investigate EBV infection in patients with LLC. A cross-sectional study of 46 patients under diagnosis of LLC and treatment effected in the periods from 2017 to 2019 was conducted. Data were obtained by reviewing medical records and recorded via electronic form with demographic, clinical aspects, hematological parameters and cytogenetic profile. For EBV detection, the polymerase chain reaction (PCR) test was used. The viral DNA was extracted using the "QIAamp DNA Mini" kit (QIAGEN) and submitted to PCR reaction, using the Ludwig Biotec commercial kit, targeting the EBNA-3C gene. It was observed that the most frequent clinical sign was splenomegaly and lymphocytosis the laboratory alteration of poor prognosis. Cytogenetic alterations were found in 36.6% of the study population and 16.67% were of poor prognosis (11q, 17p and tp53 deletion). 43.47% of patients were detected with EBV viral DNA. A statistically significant increase in complications and comorbidity and evolutions to death occurred in EBV positive patients ($p < 0.03$ and $p < 0.025$, respectively). There was a correlation between cytogenetic alterations and EBV infection ($p < 0.0001$). Noting that most of the patients diagnosed in this study with the poor prognosis cytogenetic changes had detectable viral DNA for EBV, suggesting that EBV infection may worsen the prognosis in these patients, causing a shorter survival. Most of the findings of this study are similar to those reported in the literature; however, there is a need for further studies with larger samples in order to better clarify the relation between EBV infection and LLC.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, epstein –barr vírus, cll, ebv.

1 INTRODUÇÃO

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma doença linfoproliferativa clonal de apresentação heterogênea, variando desde o achado fortuito de linfocitose isolada no sangue periférico, até quadros com grandes massas tumorais, e sinais de insuficiência medular grave ⁽¹⁾. É a leucemia crônica mais comum. A idade mediana de diagnóstico é 60 anos, sendo rara em menores de 40 anos ⁽²⁾.

A LLC está ainda associada a distúrbios do sistema imunológico que se manifestam na forma de fenômenos autoimunes e deficiência imune. Contudo, esses distúrbios do sistema imunológico podem aumentar a suscetibilidade de infecções oportunistas ou reativar patógenos latentes ⁽³⁾. As infecções que ocorrem são em sua maioria de origem viral. Entretanto, infecções por Epstein-Barr vírus (EBV) são desenvolvidas como resultado de reativação viral ⁽⁴⁾.

O EBV, designado formalmente como Gamaherpesvírus humano 4 ⁽⁵⁾, é um agente amplamente disseminado em populações humanas. Após a infecção primária o vírus estabelece latência e persiste ao longo da vida do hospedeiro em linfócitos B. Em indivíduos saudáveis, o número de células B infectadas é controlado pelas respostas

imunes do hospedeiro, no entanto, indivíduos imunocomprometidos que apresentam deficiência no número e função de células T, pode dificultar a detecção e destruição de células B infectadas com EBV. Assim, o vírus pode desempenhar um papel importante na indução de efeitos de proliferação e possivelmente na progressão da doença em pacientes com LLC ⁽⁶⁾.

O envolvimento potencial do EBV no curso clínico da LLC ainda é inexplicável. Como o EBV pode ativar as células B, estimular sua proliferação e inibir sua apoptose, supomos que ela possa contribuir para um curso clínico desfavorável da LLC e pode ser uma das razões para a heterogeneidade da doença observada. Portanto, a detecção da infecção do EBV por é de extrema importância para o prognóstico, que poderia aumentar significativamente a sobrevida do indivíduo acometido.

A leucemia linfocítica crônica é tipicamente caracterizada por imunossupressão já manifestada nas fases iniciais da doença. Embora a LLC não seja considerada uma doença associada ao EBV, as células da LLC expressam o receptor do complemento que serve como receptor do EBV. Dados pré-clínicos indicam que as células LLC são difíceis de crescer após a exposição ao EBV, embora isso possa ser alcançado após a ativação de citocinas ou pelo crescimento bem-sucedido de células LLC infectadas com EBV *in vivo* ^(7,8).

Um estudo epidemiológico recente relatou uma associação entre infecção por EBV e risco de desenvolver LLC. Tarrand et al ⁽⁹⁾ relataram que os níveis de mRNA de LMP1 eram mais altos em pacientes com LLC do que em indivíduos saudáveis (14% vs. 1% dos controles saudáveis), sugerindo que a expressão tardia do gene EBV ocorre pelo menos em um subconjunto de células LLC. O mesmo grupo relatou que 38% dos pacientes com LLC apresentaram evidência de infecção por EBV por hibridação *in situ* para EBV EBER1, uma pequena espécie de RNA não codificante. Além disso, a infecção por EBV correlacionou-se com o curso clínico acelerado, incluindo a transformação de Richter ⁽¹⁰⁾. Outro estudo mostrou uma relação entre infecção latente por EBV e casos de LLC expressando a configuração do receptor de células B *IGHV4-34* ⁽¹¹⁾.

Apesar da maioria das infecções pelo EBV ser assintomática a alta prevalência deste vírus na população mundial, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, tais como paciente oncológicos, onde a infecção primária pode ser reativada qualquer momento, explica a necessidade do diagnóstico deste vírus. E a detecção precoce do EBV

é crucial para avaliação da terapia, em busca de um tratamento eficaz e melhor prognóstico de pacientes com doenças proliferativas como a LLC.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos Gerais - O presente trabalho trata-se de um estudo transversal realizado com quarenta e seis (46) pacientes com diagnóstico prévio de LLC, atendidos regularmente em hospital de referência no tratamento onco-hematológico de Belém – PA, no período de 2017 a 2019. Foram utilizadas, de cada paciente, amostras de sangue total coletadas em tubos contendo EDTA K2 como anticoagulante. Após a coleta, todas as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 min, a 1.400 g (3.000 rpm) para a separação do plasma e porção celular (buffy coat). Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -70° C até o momento do uso.

Questões Éticas - Este estudo foi submetido e aprovado (CAAE: 15025519.4.1001.5174) pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade do Estado do Pará – UEPA, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CAMPUS II, como parte de um estudo mais amplo acerca da avaliação de marcadores tumorais no prognóstico clínico e terapêutico dos pacientes, pelo mesmo grupo de pesquisa.

Aquisição de dados - Os dados dos pacientes foram obtidos do Hospital Ophir Loyola, centro de referência para tratamento de neoplasias no Estado do Pará, a partir da revisão dos prontuários médicos e, posteriormente, registrados em formulário eletrônico contendo informações sobre aspectos demográficos e clínicos, parâmetros hematológicos e caracterização citogenética (FISH).

Extração do DNA viral - Para a extração de DNA das frações sangue total, foi utilizado o kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O método consiste em três principais etapas: Lise, lavagem e eluição e baseia-se na capacidade que a sílica tem de formar ligação com o DNA viral em meios com alta concentração de sal combinada à centrifugação em alta velocidade (8.000 a 14.000 rpm). Ao final desse processo, o DNA extraído foi armazenado a -20°C até o momento do teste de detecção e quantificação.

Reação em cadeia da polimerase (PCR) - O teste de detecção qualitativa de EBV foi realizado a partir do DNA extraído do plasma, utilizando a metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR), por meio do kit comercial Ludwig Biotec, de acordo com o protocolo do fabricante. A técnica de PCR convencional possuía como alvo o gene EBNA-3C e consistia na realização de duas PCRs e posterior detecção em gel de agarose

1%. Os reagentes necessários foram tampão PCR 2X, água ultrapura, dNTPs (2,5mM), MgCl₂ (50mM), primers forward EP e AP (100µM), primers reverse EP e AP 60 (100µM), Taq DNA polimerase e amostra extraída. Todas as reações foram executadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System, da Applied Biosystems e as análises de amplificação foram feitas no software do equipamento.

Procedimentos analíticos - A análise estatística dos dados foi realizada utilizando pacote estatístico BioEstat v5.043 O programa usado para a elaboração de gráficos e tabelas foi o Microsoft Excel[®] 2010. Calcularam-se as frequências absoluta e relativa quanto à distribuição de cada variável na população. Para verificar a associação dos aspectos clínicos e laboratoriais com as alterações citológicas, foram realizados testes de qui-quadrado e o teste G para testar a associação de variáveis categóricas com os desfechos de positividade para os vírus estudados e seus marcadores. Considerando o intervalo de confiança de 95% (ou nível de significância de 0,05).

Área de naturalidade dos pacientes- Os pacientes pertencem às seguintes cidades e municípios: Belém, Abaetetuba, Barcarena, Altamira, Ananindeua, Moju, Pacajá, Marabá, Parauapebas, Vitória do Xingu, Porto de Moz, Breves, Itupiranga, Paragominas, Tomé-Açu, São Domingos do Capim, Irituia, Bragança, Acará, Salinópolis, Castanhal e Vigia. Todas as localidades são pertencentes ao estado do Pará, Brasil.

3 RESULTADOS

Participaram deste estudo 46 pacientes com idade de diagnóstico entre 32 a 94 anos, com média de 61,71 anos (DP ± 17,56) dentre eles 58,70% eram homens, e 41,30% mulheres. Quanto à raça/etnia, 19,57% se autodeclararam brancos, 26,09% pardos e 2,17% pretos. Quanto à procedência 32,61% residem em Belém/capital e 67,39 de demais localidades.

Das ocupações exercidas pelos pacientes, destacaram-se as de dona de casa e aposentado, com frequência de 17,39% cada, e o restante realizavam outras atividades diversificadas. Com relação ao histórico de câncer, quase 20% dos pacientes possuíam antecedente familiar positivo e apenas 4,35% antecedente pessoal positivo. A tabela 1 apresenta a caracterização geral do perfil epidemiológico e clínico da população em estudo. Ao diagnóstico, cerca de 78% desses apresentavam-se sintomáticos, sendo os sintomas B os mais encontrados.

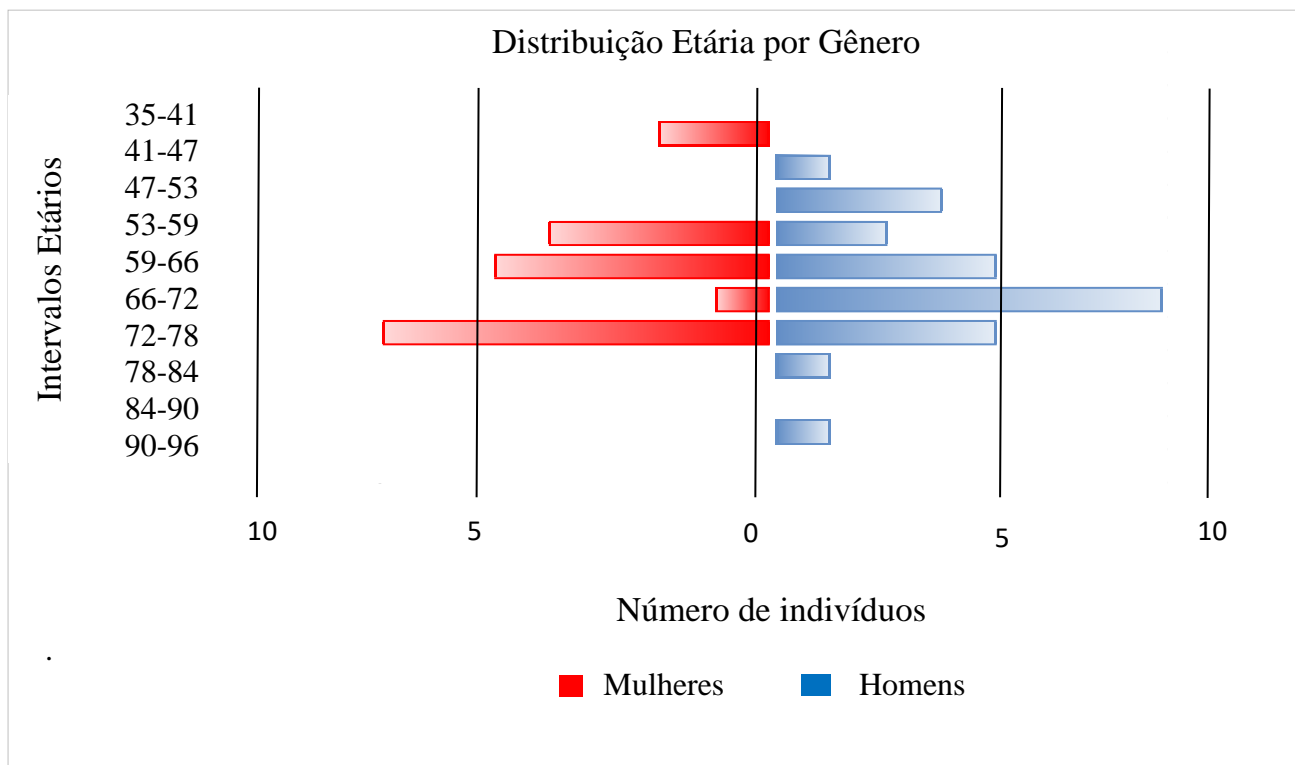
Tabela 1 - Perfil epidemiológico dos pacientes em estudo

Características sócio-demográficas e clínicas dos pacientes em estudo		
Variáveis	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Sexo		
Masculino	27	58,70
Feminino	19	41,30
Idade (anos)		
<60 anos	12	26,09
60-70 anos	16	34,78
>70 anos	16	34,78
Não informado	2	4,35
Profissão		
Agricultor	3	6,52
Pescador	3	6,52
Dona de casa	8	17,39
Aposentado (a)	8	17,39
Demais	24	52,17
Etnia		
Branca	9	19,57
Parda	12	26,09
Preta	1	2,17
Não informado	24	52,17
Procedência		
Belém capital	15	32,61
Demais localidades	31	67,39
Histórico familiar de câncer		
Sim	9	19,57
Não	33	71,74
Sem informações	4	8,70
Histórico pessoal de câncer		
Sim	2	4,35
Não	40	86,96
Sem informações	4	8,70
Sintomas B		
Presente	27	58,70
Ausente	19	41,30
Astenia		
Presente	11	23,91
Ausente	35	76,09
Manifestações. Hemorrágicas		
Presente	4	8,70
Ausente	42	91,30
Adenomegalia		
Presente	6	13,04
Ausente	40	86,96
Esplenomegalia		
Presente	13	28,26
Ausente	33	71,74
Hepatomegalia		
Presente	6	13,04
Ausente	40	86,96

Fonte: Próprio autor.

Quanto ao gênero, 58,1% dos pacientes estudados são homens (n=27) e 4,9% são mulheres (n=18). O sexo masculino tem uma média de idades ao diagnóstico de 65,6 anos e as mulheres de 63,1 anos. Esta distribuição etária por sexo encontra-se representada na Figura 1.

Figura 1 - Distribuição etária por sexo



A maior parte dos pacientes analisados (50,00%) apresentava comorbidades e/ou complicações. Entre os 46 pacientes analisados, um percentual de 67,39% necessitou realizar tratamento para a LLC e 17,39% evoluíram para óbito.

Os valores estatísticos das variáveis do hemograma, de LDH, bem como da presença de comorbidades, podem ser visualizados na Tabela 2. Quanto à concentração de hemoglobina, os dados mostraram que metade dos pacientes apresentava anemia no momento do diagnóstico, tomando-se como ponto de corte 11,5g/dL. Avaliou-se também a prevalência de trombocitopenia, obtendo-se um percentual de 23,91% (n=11) com concentração de plaquetas abaixo do valor normal (150.000 μ L).

Tabela 2- Estratificação das características clínico-laboratoriais e de prognóstico dos pacientes ao diagnóstico.

	Sintomática	Assintomática	
Apresentação inicial da doença	36 (78,26%)	10 (21,74%)	
Comorbidades	Presente	Ausente	Não informado
	21 (45,65%)	23 (50,00%)	2 (4,35%)
Necessidade de tratamento	Sim	Não	Não informado
	31 (67,39%)	14 (30,43%)	1 (2,17%)
Internações	Sim	Não	Não informado
	7 (15,22%)	23 (50%)	16 (34,78%)
Óbito	Sim	Não	Não informado
	9 (17,39)	33 (73,91%)	4 (8,70%)
Anemia	Presente	Ausente	Não informado
	23 (50%)	19 (41,30%)	4 (8,70%)
Trombocitopenia	Presente	Ausente	Não informado
	11 (23,91%)	32 (69,56%)	3 (6,52%)
Linfocitose	Linfocitose	Linfocitose	Não informado
	$\leq 50.000/\text{mm}^3$	$\geq 50.000/\text{mm}^3$	3 (6,52%)
LDH	$\leq 480 \text{ U/l}$	$\geq 480 \text{ U/l}$	Não informado
	23 (50,00%)	3 (6,52%)	20 (43,48%)

Fonte: próprio autor.

Dos 46 pacientes incluídos na pesquisa, 42 possuíam o exame citogenético por FISH. Desses, 26 não apresentaram anomalias cromossômicas. Em 14 pacientes foi encontrada isoladamente uma alteração, sendo 7 pacientes com del13q, 2 pacientes com trissomia do cromossomo 12, 2 pacientes com deltp53, 2 pacientes com del11q e 1 paciente com del17p. Apenas 2 pacientes tinham dupla alteração citogenética, sendo 1 paciente com del17p e del13q e 1 paciente com del17p e deltp53.

E neste estudo os pacientes foram divididos em 4 grupos, dependendo da presença/ausência e tipo de alterações citogenéticas na altura do diagnóstico e, no caso de as possuírem, do prognóstico associado a cada uma delas. Assim sendo, foram definidos os seguintes grupos: 1- Grupo de pacientes sem alterações citogenéticas; 2- Grupo de pacientes com alteração citogenética de bom prognóstico (deleção 13q); 3- Grupo de pacientes com alteração citogenética de prognóstico intermédio (trissomia do 12); 4- Grupo de pacientes com alterações citogenéticas de mau prognóstico (deleção 11q /17p/ deltp53).

Tabela 3 - Caracterização da população com base na presença/ ausência e tipo de alterações citogenéticas, relativamente ao número de pacientes (N), porcentagem (%).

Grupos	Sem alt. citogenéticas	Del13q	Trissomia do 12	Del11q / del17p/ deltp53
N	26	7	2	7
Porcentagem (%)	61,9	16,67%	4,76%	16, 67%
Idade ao diagnóstico (anos) ($\bar{x} \pm DP$)	68,1 \pm 9,8	60,2 \pm 11,0	58 \pm 0,0	59,4 \pm 14,7

Fonte: Próprio autor.

Os dados da associação entre as características clínicas e laboratoriais com as alterações citogenéticas dos pacientes estão apresentados nas tabelas 4, utilizando o teste de qui-quadrado para análise de determinação de resultados estatisticamente significativos.

Tabela 4 - Análise de associação entre as características clínicas e laboratoriais e alterações citogenéticas utilizando o teste de qui-quadrado. Na tabela são apresentadas as frequências relativas de cada contagem e o valor de *p*.

Características clínicas e laboratoriais	Alterações citogenéticas														
	del13q			del17q			del11q			deltp53			trissomia do 12		
	sim (%)	não (%)	<i>p</i>	sim (%)	não (%)	<i>p</i>	sim (%)	não (%)	<i>p</i>	sim (%)	não (%)	<i>p</i>	sim (%)	não (%)	<i>p</i>
Evoluiu a óbito (N= 41)															
sim	2,44	14,63	0,83	4,88	12,20	0,02*	0,00	17,07	0,51	4,88	12,20	0,000003*	0,00	17,07	0,51
Não	14,63	68,29		2,44	80,49		4,88	78,05		80,49	2,44		4,88	78,05	
Realizou Tratamento (N= 41)															
sim	14,63	58,54	0,41	7,32	65,85	0,28	4,88	68,29	0,38	7,32	65,85	0,28	0,00	73,17	0,02*
Não	2,44	24,39		0,00	26,83		0,00	26,83		0,00	26,83		4,88	21,95	
Complicações e comorbidades (N= 41)															
sim	14,63	34,15	0,10	2,44	46,34	0,58	0,00	48,78	0,32	2,44	46,34	0,58	0,00	48,78	0,16
Não	4,88	46,34		4,88	46,34		2,44	48,78		4,88	46,34				
Necessidade de Internação (N= 29)															
sim	6,90	17,24	0,75	3,45	20,69	0,38	0,00	24,14	0,57	0,00	24,14	0,57	0,00	24,14	1,00
Não	17,24	58,62		3,45	72,41		3,45	72,41		3,45	72,41				
Linfocitose (N= 42)															
≥ 50.000 mm ³	7,14	23,81	0,66	2,38	28,57	0,93	0,00	30,95	0,33	2,38	28,57	0,93	0,00	30,95	0,33
< 50.000 mm ³	11,90	57,14		4,76	64,29		4,76	64,29		4,76	64,29				
Presença de Anemia (N= 41)															
sim	9,76	46,34	0,70	4,88	51,22	0,70	2,44	53,66	0,86	4,88	51,22	0,70	0,00	56,10	0,10
Não	9,76	34,15		2,44	41,46		2,44	41,46		2,44	41,46				

Sintomas B (N = 42)															
sim	9,52	52,38	0,44	7,14	54,76	0,16	0,00	61,90	0,06	4,76	57,14	0,86	0,00	61,90	0,06
Não	9,52	28,57		0,00	38,10		4,76	33,33		2,38	35,71		4,76	33,33	
DHL (N = 25)															
≥480 U/l	7,69	3,85	0,06	0,00	11,54	0,60	0,00	11,54	0,60	0,00	11,54	0,60	0,00	11,54	0,60
<480 U/l	15,38	73,08		7,69	80,77		7,69	80,77		7,69	80,77		7,69	80,77	
Hepatomegalia (N = 42)															
sim	7,14	7,14	0,04*	0,00	14,29	0,46	0,00	14,29	0,55	4,55	13,64	0,02*	0,00	14,29	0,55
Não	11,90	73,81		7,14	78,57		4,76	80,95		2,27	79,55		4,76	80,95	
Presença de plaquetopenia (N= 41)															
sim	14,63	68,29	0,51	7,32	75,61	0,41	4,88	78,05	0,51	2,44	80,49	0,02*	4,88	78,05	0,51
Não	4,88	12,20		0,00	17,07		0,00	17,07		4,88	12,20		0,00	17,07	
Linfadenopatia (N = 42)															
sim	11,90	26,19	0,11	2,38	35,71	0,86	2,38	35,71	0,72	0,00	38,10	0,16	0,00	38,10	0,26
Não	7,14	54,76		4,76	57,14		2,38	59,52		7,14	54,76		4,76	57,14	
Sintomas ao diagnóstico (N = 42)															
sintomático	16,67	66,67	0,72	7,14	76,19	0,42	2,38	80,95	0,19	7,14	76,19	0,42	2,38	80,95	0,19
assintomático	2,38	14,29		0,00	16,67		2,38	14,29		0,00	16,67		2,38	14,29	

* mostra os valores de *p* estatisticamente significativos.

A prevalência da infecção pelo EBV nos pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) foi de 43,47% (20/46). A prevalência da infecção pelo EBV foi correlacionada com as variáveis clínicas, sendo observada relação estatisticamente significante com das variáveis (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise de associação entre as características clínicas e laboratoriais com casos de EBV positivos e negativos por PCR dos pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) .

Características Clínicas e laboratoriais	EBV-DNA (+) N (%)	EBV-DNA (-) N (%)	Valor P
Idade			
< 60 anos	7 (15,21)	5 (10, 86)	0, 23
≥ 60 anos	13 (28,26)	18 (39,13)	
Sexo			
Masculino	9 (19,6)	18 (39,1)	0,17
Feminino	11 (23,91)	8 (17,39)	
Estádio			
Rai ≥ estágio II	10 (21, 73)	10 (21,73)	0,86
Binet ≥ estágio B	9 (19,56)	11 (23,90)	
Evoluiu a óbito			
Sim	6 (13,05)	3 (6,52)	0,025*
Não	14 (30,43)	23 (50,0)	
Realizou Tratamento			
Sim	16 (34,78)	14 (30,43)	0,12
Não	4 (8,69)	12 (26,1)	
Complicações e comorbidades			
Sim	15 (32,60)	10 (21,74)	0,03*
Não	5 (10,88)	16 (34,78)	

Necessidade de Internação			
Sim	4 (8,69)	2 (4,34)	0,43
Não	16 (34,78)	24 (52,19)	
Linfocitose			
≥ 50.000 mm ³	12 (26,08)	17 (36,96)	
< 50.000 mm ³	8 (17,39)	5 (10,86)	0,51
Presença de Anemia			
Sim	11(17,39)	6(13,04)	
Não	9 (19,5)	16 (34,78)	0,84
Sintomas B			
Sim	17 (36,95)	20 (43,47)	
Não	3 (6,52)	6 (13,06)	0,76
LDH			
≥480 U/l	2 (8,00)	2 (8,00)	
<480 U/l	8 (32,00)	13 (52,00)	0,91
Hepatomegalia			
Sim	5 (10,86)	1 (2,17)	
Não	15 (32,60)	25 (54,37)	0,094
Presença de plaquetopenia			
Sim	5 (10,86)	3 (6,52)	
Não	15 (32,60)	20 (43,79)	0,54
Linfadenopatia			
Sim	7 (15,21)	7 (15,21)	
Não	13 (28,26)	19 (41,32)	0,78

Fonte: Próprio autor. * mostra os valores de *p* estatisticamente significativos

Na população estuda, a positividade para EBV foi maior nos pacientes que apresentam alterações citogenéticas. Demonstrando significância estatística entres as variáveis ($p < 0,0001$), como evidenciado pela Tabela 6.

Tabela 6 – Correlação entre a infecção de EBV com as variáveis citognéticas dos portadores de LLC.

Alterações Citogenéticas	EBV (+), N/16 (%)	EBV (-), N/16 (%)	Valor de <i>p</i>
Bom/ Interm. Prognóstico	6 (37,5%)	3 (18,75)	
Mau Prognóstico	6 (37,5%)	1 (6,25%)	0,0001*

Fonte: Próprio autor.
*Teste G

4 DISCUSSÃO

A infecção por EBV está associada a uma ampla gama de doenças malignas e não malignas. E tem sido associada a muitas neoplasias, como as neoplasias hematológicas de gravidade variáveis, pois a infecção pelo EBV induz a proliferação de linfócitos B e um aumento no número de células B com risco de mutações oncogênicas e expansão clonal, caracterizadas por positividade para LMP1 e antígeno nuclear de EBV (EBNA), como parte da latência tipo 3 do vírus. Este tipo de latência caracteriza a diminuição da imunovigilância do hospedeiro. Na LLC, há vários estudos que sugerem que o EBV pode

desempenhar um papel de acelerador do curso clínico da doença, resultando em um linfoma mais agressivo com pior prognóstico ^(12,13).

No presente estudo a idade média ao diagnóstico de LLC é de 61,7 anos, com mínima e máxima de 32 e 94 anos, respectivamente. Estes valores estão de acordo com vários autores, que confirmam que a média de idade ao diagnóstico se fixa entre os 60 e os 72 anos ^{14,15,16}.

Dos pacientes, 26,09% têm idade de diagnóstico inferior a 60 anos, corroborando com estudos de Marcos-Gragera et al ¹⁷ e Howlader et al ¹⁸, que foram efetuados na Europa e nos EUA, concluíram que apenas 10 a 28% dos pacientes com LLC tinham idades de diagnóstico inferiores a 60 anos. Outros estudos europeus indicam que 7 a 20% dos portadores de LLC têm idade inferior a 55 anos ao diagnóstico ⁽¹⁹⁾.

Os valores médios de idade obtidos corroboram com a literatura, sendo relatado o aumento da incidência da LLC com o avanço da idade, sendo a idade jovem um fator independente de bom prognóstico, associada a maior sobrevivência ⁽²⁰⁾.

Quanto a variável gênero, os pacientes do sexo masculino são os mais afetados. Estes resultados estão de acordo com os resultados de SCARFÓ et al ⁽¹⁵⁾, Ferreira ⁽¹⁹⁾ e HALLEK ⁽¹⁶⁾, que descrevem um predomínio do sexo masculino na LLC. A razão para o maior número de casos de a doença ser em homens é desconhecida, mas podem estar associados à predisposição genética ^(21, 22).

As mutações dos genes NOTCH1 e SF3B1 também podem estar envolvidas na diferença entre os sexos em relação às respostas aos tratamentos ⁽²¹⁾. A relação M:F nos casos de linfocitose B-monoclonal, uma condição precursora da LLC, é menor do que na LLC, isto significa que a doença parece iniciar-se igualmente entre os sexos e então se torna mais representativa nas mulheres durante a progressão da doença ⁽²¹⁾. Baumann et al ⁽²³⁾ observaram a predominância do sexo masculino em pacientes com menos de 70 anos de idade, porém entre os idosos ambos os sexos foram iguais. A razão para o aumento do sexo feminino entre pacientes idosos pode ser devido à maior sobrevivência e melhor resposta ao tratamento em mulheres ⁽²¹⁾, porém ainda não há uma boa hipótese para explicar essa tendência de melhor prognóstico em mulheres.

Houve leve predominância de pacientes da raça/etnia parda. Entretanto, mais da metade dos pacientes não possuíam essa informação nos prontuários. Segundo dados da The American Society of Hematology, cerca de 80% dos pacientes diagnosticados com LLC são da raça branca ⁽²⁴⁾.

Das ocupações exercidas pelos pacientes, destacaram-se as de dona de casa e aposentado, com frequência de 17,39% cada, e o restante realizavam outras atividades diversificadas. 32,61% residiam em Belém/capital e a grande maioria era proveniente de outras localidades.

Com relação ao histórico de câncer, quase 20% dos pacientes possuíam antecedente familiar positivo e apenas 4,35% antecedente pessoal positivo, porém sem especificação do tipo. Pesquisas apontam que a incidência de LLC é maior em indivíduos com histórico familiar para a doença ⁽²⁵⁾.

No que se refere, a apresentação clínica inicial, a grande maioria dos pacientes estavam sintomáticos, sendo os sintomas B os mais comuns, seguidos de esplenomegalia e astenia. Tal constatação é contrária à relatada na literatura, que mostra que até 70% dos pacientes apresentam-se inicialmente assintomáticos. Isso pode ser explicado pelo fato de que, segundo pesquisas, os pacientes de países em desenvolvimento costumam receber atendimento médico primário em estágios mais avançados. E pela qualidade e acesso aos sistemas de saúde, embora também haja influência de fatores ambientais e genéticos ^(26,27,28).

Neste estudo, o sinal clínico mais frequente foi a esplenomegalia (28,26%), dado em consistência com os resultados encontrados por Gonçalves et al ⁽²⁹⁾ de 22%, mas inferior aos resultados mais elevados de Hasan et al ⁽³⁰⁾, Nwannadi et al ⁽³¹⁾ e Padaro et al ⁽³²⁾, (64,8%, 72,2% e 71%, respectivamente). A hepatomegalia foi observada em 13,04% dos pacientes, semelhante aos dados de Gonçalves et al ⁽²⁹⁾ de 13% e de Basabaeen et al ⁽³³⁾ de 12,7%, mas inferior aos de Hasan et al ⁽³⁰⁾ e Padaro et al ⁽³²⁾ (21,9% e 26%, respectivamente). Linfadenopatia foi observada em 13,04%, enquanto Padaro et al ³² e Tejaswi et al ⁽³⁴⁾ e relataram uma porcentagem maior em suas pesquisas (49% e 28%).

A frequência de anemia (50%) e plaquetopenia (23,91%) no estudo atual foi comparável à relatada em pesquisas anteriores em que o nível de hemoglobina e plaquetas abaixo de valores normais foi documentado em até 54,16% e 40%, respectivamente. Tais alterações hematimétricas são consideradas fatores de risco para uma evolução desfavorável e menor sobrevida ^(35,36).

Linfocitose acima de 50.000 foi encontrada em 30,43% dos pacientes. Estudo realizado na Nigéria demonstrou que pacientes com LLC que possuíam hiperleucocitose tiveram uma taxa de sobrevida mediana pior e estatisticamente significativa comparada

aqueles com contagens de leucócitos mais baixas, sugerindo que uma alta carga tumoral é uma característica de mau prognóstico ⁽³⁷⁾.

A partir da confirmação do diagnóstico de LLC, torna-se de suma importância a análise da existência de comorbidades dos pacientes para prognóstico adequado. Dentro do presente estudo, 45,65% dos pacientes apresentaram comorbidades e complicações. Um estudo de base populacional com 400 pacientes com LLC identificou que 99,5% dos pacientes apresentaram pelo menos uma comorbidade ao diagnóstico. Um escore elevado de comorbidades influenciou negativamente na sobrevida relativa dos pacientes, mas sem efeito estatisticamente significativo na mortalidade ⁽³⁸⁾. Outro estudo semelhante, no entanto, identificou que pacientes idosos com disfunções renais possuíram mau prognóstico sob tratamento com fludarabina ⁽³⁹⁾.

Em relação aos resultados de detecção de anormalidades cromossômicas por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH), a porcentagem de indivíduos com alterações citogenéticas com mau prognóstico (del11q, del17p e deltp53) foi igual ao grupo ao grupo de bom prognóstico (del13q) com 16,67% em ambos.

Estudos realizados por Shahjahani et al ⁽⁴⁰⁾ e Baliakas et al ⁽⁴¹⁾, demonstram que as alterações cromossômicas mais frequentes detectadas em pacientes portadores de LLC são: del13q (40-60%) e trissomia 12 (15-20%), já no presente estudo houve um equilíbrio entre as alterações del13q, del11q de17p e deltp53. Isso pode ser explicado pelo aumento de pacientes com recaídas sucessivas durante o tratamento, elevando a frequência de del17p e a mutação do gene p53 ⁽⁴²⁾.

E em relação as características clínicas ligadas com o padrão citogenético dos pacientes analisados. Foi identificado significância estatística entre os indivíduos sem deleção 13q (del13q) e que não apresentaram hepatomegalia. Apesar disso, tal deleção quando encontrada está associado a uma resposta favorável, presença de sintomas leves e sobrevida mais longa. Isso pode variar se houver envolvimento de locus RB1 do gene, com progressão para formas mais graves ^(43, 44).

Em pacientes com ausência da deleção do gene 17p (del17p) houve uma diminuição estatisticamente significativa dos óbitos ($p < 0,02$). Tal resultado é elucidado por Sales ⁽⁴⁵⁾ ao averiguar a relação da del17p e seu acometimento especificamente na banda 17p13 do gene supressor tp53 corrobora para prognóstico desfavorável do paciente, sendo a interação genética mais ligada aos óbitos. Em contrapartida, a presença da deleção do gene tp53 (deltp53) relacionou-se com a diminuição dos óbitos nos pacientes

($p < 0,000003$), dado contrário ao relatado na literatura. Isso pode ter ocorrido pela hipótese de que nem todos os pacientes foram submetidos a testes de mutação TP53, bem como ao fato de que a del17p resulta na perda de TP53, sendo necessária a análise conjunta de ambas as alterações como um marcador de prognóstico associado a resultados ruins ⁽⁴⁶⁾.

A ausência de hepatomegalia também foi averiguada em pacientes sem a deltp53. Contudo, a não presença dessa alteração foi estatisticamente associada a presença de plaquetopenia em 80,49% dos pacientes. Complicações autoimunes secundárias à LLC que alteram a hemodinâmica são conhecidas no quadro clínico do paciente: a trombocitopenia é comum inclusive na fase ativa da doença, podendo resultar na púrpura trombocitopênica idiopática ⁽⁴⁷⁾.

Dessa forma, realização da análise de FISH é essencial não só para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e tratamento de LLC, como também nas recaídas passa a ser muito importante ⁽²⁵⁾.

O EBV é ubíquo e aproximadamente 95% da população já entrou em contato com vírus. A infecção primária pode ocorrer em crianças menores de cinco anos de idade ou em adolescentes e adultos jovens, variando de acordo com a região geográfica e padrões de higiene ^(48, 12). No presente estudo, verificou-se que 20 pacientes, cerca de 43,5%, apresentaram DNA viral detectável. Os resultados foram inferiores aos encontrados por Visco et al ⁽⁴⁹⁾ na Itália, que descreveram positividade para EBV em 59% dos pacientes com LLC. Grywalska et al ⁽⁵⁰⁾ na Polônia, também demonstraram que 54% dos pacientes com LLC do seu estudo possuíam DNA de EBV detectável. Os dados ora apresentados demonstram a presença do EBV e a sua epidemiologia em indivíduos portadores LLC do estado do Pará.

O presente estudo investigou a presença do EBV, através da técnica molecular de PCR em pacientes com leucemia linfocítica crônica, previamente diagnosticados. Verificou-se 28,26% dos pacientes com idade ≥ 60 anos apresentaram DNA viral detectável, enquanto que em pacientes com idade < 60 anos a detecção do EBV diminuiu para 15,21%. Dados semelhantes foram encontrados por Tabibzadeh et al ⁽¹³⁾ na Ásia Central, que descreveram o DNA viral sendo detectado em 14,8% dos pacientes portadores de LLC com idade média de 60 anos.

No Brasil, os primeiros estudos epidemiológicos relacionados ao EBV foram descritos por Black e colaboradores no ano de 1970 e 1974 ⁽⁵¹⁾. Eles analisaram a

prevalência de diversos herpesvírus, dentre eles o EBV, em tribos indígenas isoladas na Amazônia, como os Tiriyo e Kayapós. Esses estudos ressaltaram a grande abrangência do EBV a nível global ao ser constatado infecção em tribos distantes da sociedade urbanizada.

Assim, o EBV foi o primeiro vírus tumoral a ser descoberto e que continua a ser estudado e associado a um vasto número de doenças humanas ⁽⁵²⁾.

Das características clínicas examinadas foram observadas entre os pacientes EBV positivos e negativos um aumento estatisticamente significativo de óbitos e comorbidades e complicações, ($p < 0,025$ e $p < 0,03$, respectivamente). Abrisqueta et al ⁽⁵³⁾ detectaram DNA viral de EBV em pacientes com LLC na Espanha. Cerca de 21% dos pacientes não receberam tratamento devido a fragilidade e comorbidades, atuando negativamente no prognóstico e sobrevida relativa desses pacientes. Xu et al ⁽⁵⁴⁾ analisaram as variáveis clínicas em 97 pacientes com LLC, deste 21,6% foram diagnosticados com EBV. Setenta pacientes (72,2%) tiveram indicação e receberam tratamento. Dezesete (17,5%) indivíduos morreram de causas relacionadas à LLC e com alta carga viram de EBV.

Tabibzadeh et al ⁽¹³⁾ pesquisaram a epidemiologia do EBV em doenças linfoproliferativas, dentre elas a LLC, associando a infectividade do EBV com essas doenças analisando as diferentes variáveis clínicas (idade, sexo, leucócitos, Hb e Plt) e observou que não teve nenhum resultado significativo ($p > 0,05$), independentemente do grupo de doença linfoproliferativo estudado.

No estudo de correlação entre as variáveis citogenéticas e EBV, houver significância estatística com valor de $p < 0,0001$. Constatou-se que a infecção por EBV está associada aos pacientes com os piores prognósticos para LLC, e isso pode ser confirmado devido a maioria dos pacientes diagnosticados com as alterações citogenéticas de mau prognóstico como deleção 11q, 17p e tp53 apresentarem DNA viral detectável para EBV.

O vírus de Epstein Barr foi associado à transformação de Richter, que é considerada a evolução mais agressiva da LLC e essa síndrome acompanham-se, em geral, de deleção 17p. O gene TP53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, ele é o codificador da proteína p53, a principal responsável pela apoptose celular ⁽⁵⁵⁾.

Segundo Fries et al ⁽⁵⁶⁾ o EBV induz a expressão dos genes celulares antiapoptóticos bcl-2 e A20 e pode, desta forma, interferir na apoptose mediada por p53. O estudo relatado por Li et al ⁽⁵⁷⁾ descreveu o p53 como um alvo funcionalmente relevante do EBV para potencializar sua replicação lítica em carcinomas. Além disso, vários

estudos demonstraram que os linfomas dirigidos por EBV pode regular ainda mais o gene p53. Também descobriram que expressões mais altas de EBV-BHRF1-1 foram associadas a proteínas p53 e p53 mais baixas, o que pode refletir o papel funcional do gene p53 em pacientes com LLC.

Diante disso, a infecção por EBV predominante nos pacientes diagnosticados com alterações citogenéticas (del11q/ del17p13/ deltp53) podem ter uma desvantagem de sobrevida em comparação com os pacientes com EBV negativos, pois estas alterações citogenéticas estão ainda associadas a estágio Rai de alto risco e a menor sobrevida livre de terapêutica e global ⁽¹⁹⁾.

Além disso, a infecção ou reativação de EBV em pessoas imunossuprimidas, como os portadores de LLC pode desencadear a ativação de células B e T, o que pode aumentar o risco de linfoproliferações não controladas e, portanto, maior probabilidade de mutações transformadoras. O EBV também pode ser um dos patógenos envolvidos na desregulação indireta das células B ⁽⁴⁾.

Essas fortes correlações representam uma nova perspectiva na pesquisa da patogênese da LLC, e este é o primeiro, até onde sabemos, uma desvantagem na sobrevida de pacientes EBV positivos com LLC. Nenhum dos pacientes EBV positivos estudados evoluiu para a transformação de Richter, durante o período de acompanhamento.

E é importante ressaltar que este estudo apresentou algumas limitações, como por exemplo, o pequeno tamanho da amostra que não permitiu um exame detalhado das interações entre os resultados do EBV e as variáveis da LLC. Outra limitação foi a falta da realização da quantificação da carga viral de DNA do EBV, pois a quantificação da carga viral do EBV pode ser importante para a patogênese e o prognóstico da doença, especialmente em pacientes com malignidade. Mas nosso estudo pela primeira vez mostrou a associação da LLC com o vírus EBV em grupos populacionais no Estado do Pará.

Em nossos achados, verificou-se que cerca de 43,47% de nossa população tinha DNA detectável de EBV, corroborando com a maioria da literatura. Foram encontrados dados estatisticamente significativos para a correlacionar as alterações citogenética com o EBV. Constatando-se que a infecção por EBV pode estar associada aos pacientes com os piores prognósticos para LLC, sugerindo assim, que a infecção por EBV possa piora o prognóstico da doença, devido todos os pacientes diagnosticados nesse estudo com as alterações citogenéticas de mau prognóstico como deleção 11q, 17p e tp53 apresentarem

DNA viral detectável para EBV e alguns deles acabaram evoluindo a óbito, sustentando está associação entre EBV e LLC.

Dessa forma, evidenciou-se a necessidade de estudos com maior casuística, a fim de melhor esclarecer a correlação da infecção por EBV em pacientes portadores de LLC.

REFERÊNCIAS

1. Kikushige Y. Pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and the development of novel therapeutic strategies. *J Clin Exp Hematop.* 2020 Dec 15; 60(4):146-158. doi: 10.3960/jslrt.20036. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33148933; PMCID: PMC7810248.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020 incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2020. 142 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
3. Kimura, H.; Cohen, J.I. Doença Viral Doença De Epstein-Barr Crônica. *Frente Immunol.*; 8: 1867, 2017.
4. Casabonne D, Benavente Y, Robles C, et al. Padrões de anticorpos aberrantes do vírus Epstein-Barr e leucemia linfocítica crônica em um estudo multicêntrico caso-controle espanhol. *Infect Agent Cancer* .10: 5, 2015.
5. ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy list 2020. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>>.
6. Grywalska, E.; Roliński, J.; Pasiarski, M.; Korona-Glowniak, I.; Maj, M.; Surdacka, A.; Grafka, A.; Stelmach-Gołdyś, A.; Zgurski, M.; Gózdź, S.; Malm, A.; Grabarczyk, P.; Starosławska, E. High Viral Loadsof Epstein-BarrVirus DNA in Peripheral Blood of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia Associated with Unfavorable Prognosis. *PLoS ONE*10 (10): e0140178, 2015.
7. Dolcetti, R.; Carbone, A. Epstein-Barr virus infection and chronic lymphocytic leukemia: a possible progression factor? *Infectious Agents and Cancer*.5 (22): 2010.
8. Ok, Cy.; Li, L.; Xu-Monette, Zy.; Visco, C.; Tzankov, A.; Manyam, G.C.; Young, K.H. Prevalência e implicações clínicas da infecção pelo vírus epstein-barr no novo linfoma difuso de células B nos países ocidentais. *Pesquisa clínica do câncer: um jornal oficial da Associação Americana de Pesquisa do Câncer*, 20 (9): 2338–2349, 2014.
9. Tarrand, J.J.; Keating, M.J.; Tsimberidou, A.M.; O'brien, S.; Lasala, R.P.; Han, X.Y.; Bueso-Ramos, C.E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 mRNA is expressed in a significant proportion of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 116: 880–887, 2010.
10. Tsimberidou, A.M.; O'brien, S.; Kantarjian, H.M.; Koller, C.; Hagemeister, F.B.; Fayad, L.; Lerner, S.; Bueso-Ramos, C.E.; Keating, M.J. Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer*.107:1294–1302, 2006.
11. Qin, S.; Fan, L.; Liang, J.; Gale, R.; Miao, Y, et al. Definition of disease-progression risk stratification in untreated chronic lymphocytic leukemia using combined clinical, molecular and virological variables. *Hematological Oncology*. 36:656–662, 2018.
12. Williams, M.; Ariza, M.E. Ebv Positive Diffuse Large B Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Exhibit Increased Anti-dUTPase Antibodies. *Cancers*.129 (10): 2018.
13. Tabibzadeh, A.; Karbalaie, N.M.H.; Esghaei, M, et al. Molecular Epidemiology of Epstein-Barr virus (EBV) in Patients with Hematologic Malignancies. *Asian Pac J Cancer Prev*. 21(3):693-698, 2020.

14. GROUP IC-IW. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*; 17(6): 779-90, 2016.
15. Scarfò, L.; Ferreri, A.J.M.; Ghia, P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 104: 169–182, 2016.
16. Hallek M. On the architecture of translational research designed to control chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2018(1):1-8. 2018.
17. Marcos-Gragera, R.A.C.; Tereanu, C.; De Ar; Capocaccia, R, et al. Survival of European patients diagnosed with lymphoid neoplasms in 2000-2002: results of the HAEMACARE project. *Haematologica* 96(5): 720-728, 2011.
18. Howlader, N.N.A.; Kapcho, M.; Miller, D.; Bishop, K, Et Al. *Seer Cancer Statistics Review, 1975-2013*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seercancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.
19. Ferreira, R.X.O. O impacto das alterações citogenéticas na sobrevida e nos achados clínico-laboratoriais em LLC. *Dissertação (Mestrado do Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra) – Coimbra, Instituto Politécnico de Coimbra*, 2017.
20. Strati, P.; Jain, N.; O'brien, S. Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. 93(5):651-664, 2018.
21. Catovsky, D.; Wade, R.; Else, M. The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 99(6):1088-1094, 2014.
22. Zorovich, M.; Dourado, D.A.; Chauffaille, M. Chromosomal aberrations detected by Fluorescence in situ hybridization in 344 Brazilian chronic lymphocytic leukemia patients. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 39(4), 388–390, 2017.
23. Baumann, T.; Delgado, J.; Santacruz, R, et al. Leucemia linfocítica crônica em idosos: aspectos clínico-biológicos, desfechos e proposta de modelo prognóstico. *Haematologica*. 99 (10): 1599-1604, 2014.
24. Narra, R.K.; Atallah, E.L.,; Hamadani, M.; Guru Murthy, G.S.G. Population Level Outcomes of Chronic Lymphocytic Leukemia in the Era of Targeted Agents-Analysis of Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Database. *Blood* 134 Suppl 1:1757, 2019.
25. Rai, K.R.; Jain, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) -Then and now. *Am J Hematol*, 2016.
26. Payandeh, M.; Sadeghi, E.; Sadeghi, M. Survival and Clinical Aspects for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia in Kermanshah, Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 16(17):7987-90, 2015.
27. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F, et al. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*. 5(1):e14-e24, 2018.
28. Condoluci A, Terzi Di Bergamo L, Langerbeins P, Hoehstetter Ma, Herling Cd, De Paoli L, et al. International prognostic score for asymptomatic early-stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 135(21):1859-1869, 2020.
29. Gonçalves MV, Rodrigues CA, Lorand Metzke IGH, Lacerda MP, de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille M, Azevedo A, Machado C, et al. Chronic lymphocytic leukemia in Brazil: A retrospective analysis of 1903 cases. *Am J Hematol*. 2017 Aug; 92(8):E171-E173
30. HASAN, K.M. Clinical Aspects, Immunophenotypic Analysis and Survival Rate of Chronic Lymphocytic Leukaemia Patients in Erbil City, Iraq. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 18(4):e461-e467, 2018.

31. Nwannadi, A.I.; Onoja, M.A.; Mke, A. Epidemiology and Clinical Profile of Patients with Chronic Lymphocytic Leukaemia in a Tertiary Hospital in Nigeria. *J Res Bas Clin Sci.* 1(1):36-40, 2019.
32. Padaro E, Layibo Y, Kueviakoe Idm, Agbétiafa K, Magnang H, Koudokpo Nda, et al. Caractéristiques de la leucémie lymphoïde chronique au Togo [Characteristics of chronic lymphocytic leukemia in Togo]. *Pan Afr Med J.*; 34:84, 2019.
33. Basabaeen, A.A.; Abdelgader, E.A.; Babekir, E.A.; Eltayeb, N.H.; Altayeb, O.A.; Fadul, E.A, et al. Clinical presentation and hematological profile among young and old chronic lymphocytic leukemia patients in Sudan. *BMC research notes.* 12(1): 202, 2019.
34. Tejaswi, V.; Lad, D.P.; Jindal, N.; Prakash, G.; Malhotra, P.; Khadwal, A, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia: Real-World Data From India. *JCO Glob Oncol.* 6:866-872, 2020.
35. Binet, J.L.; Auquier, A.; Dighiero, G.; Chastang, C.; Piguët, H, Goasguen, J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 48(1):198-206, 1981.
36. Ayman, F.A.; Sabry, A.S.; Atef, M.; Mahmoud, A. Clinico-Hematologic Profile of Chronic Lymphocytic Leukemia in Egypt: A Three-Center Experience. *The Medical Journal of Cairo University.* 89: 9-17, 2021.
37. Korubo, K. I., OKITE, U. P., & EZEUGWU, S. I. Chronic Lymphocytic Leukemia: Prognostic Factors at Presentation in a Resource-Limited Center. *JCO Global Oncology.* 7:56-62, 2021.
38. Villavicencio, A.; Solans, M.; Zacarías-Pons, L.; Vidal, A.; Puigdemont, M.; Roncero, J.M, et al. Comorbidities at Diagnosis, Survival, and Cause of Death in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia: A Population-Based Study. *Int J Environ Res Public Health.* 18(2):701, 2021.
39. Ostasov P, Robertson H, Piazza P, Datta A, Apperley J, Houdova L, et al. Evolution of Advanced Chronic Lymphoid Leukemia Unveiled by Single-Cell Transcriptomics: A Case Report. *Front Oncol.* 10:584607, 2020.
40. Shahjahani, M; Mohammadiasl, J; Noroozi, F, Et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cell Oncol (Dordr).*;38(2):93-109, 2015.
41. Baliakas, P.; Hadzidimitriou, A.; Sutton, La. et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 29, 329–336, 2015.
42. Kersting, S.; et al. Dutch guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *The Netherlands Journal of Medicine*,74 (2):.68- 74, 2016.
43. Patkar, N.; Rabade, N.; Kadam, P.A.; Mishra, F.; Muranjan, A, Tembhare, P, et al. Immunogenetics of chronic lymphocytic leukemia. *Indian J Pathol Microbiol.* 60(1):38-422017.
44. Tari, K.; Shamsi, Z.; Reza Ghafari, H.; Atashi, A.; Shahjahani, M.; Abroun, S, et al. The role of the genetic abnormalities, epigenetic and microRNA in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Exp Oncol.* 40(4):261-267, 2018.
45. Sales, S.B. Alterações Genéticas na Leucemia Linfocítica Crônica. Tese (Especialização em hematologia e Banco de Sangue). Brasília - Academia de Ciência e Tecnologia; 2020. 9 p.
46. CLL Society. Prognostic Factors in CLL. 2017. Disponível em: <https://cllsociety.org/2017/09/prognostic-factors-ctl/> (acessado em 11/05/2021).
47. Paul, S.; Jain, N.; Ferrajoli, A.; O'brien, S.; Burger, J.; Keating, M.; Wierda, W. A phase II trial of eltrombopag for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2019.

48. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVICTION (CDC). Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 05 jun. 2021.
49. Visco, C.; Falisi, E.; Young, K.H, et al. Epstein-Barr virus DNA load in chronic lymphocytic leukemia is an independent predictor of clinical course and survival. *Oncotarget*. 6(21):18653-18663, 2015.
50. Grywalska, E.; Pasiarski, M.; Sosnowska-Pasiarska, B.; Macek, P.; Rolińska, A.; Samardakiewicz, M.; Ludian, J.; Gózdź, S.; Roliński, J. Programmed cell death 1 expression and Epstein-Barr virus infection in chronic lymphocytic leukaemia: a prospective cohort study. *Cancer management and research*, 11, 7605–7618, 2019.
51. Black, F. L. et al. Prevalence of antibody against viruses in the Tiriyo, an isolated amazon tribe. *American Journal of Epidemiology* 91(4): 430–438, 1970.
52. Jha, H. C.; Pei, Y.; Robertson, E. S. Epstein-barr virus: Diseases linked to infection and transformation. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1-16, 2016.

53. Abrisqueta, P.; Delgado, J.; Alcoceba, M, et al. Clinical Outcome and Prognostic Factors of Patients with Richter's Syndrome: Retrospective Multicenter Study of the Spanish Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Study Group (GELLC). *Blood*; 130 (Supplement 1): 2995, 2017.

54. Xu, D.M.; Kong, Y.L.; Wang, L, Et al. EBV-miR-BHRF1-1 tem como alvo o gene p53: papel potencial na leucemia linfocítica crônica associada ao vírus de Epstein-Barr. *Cancer Res Treat* .52 (2): 492-504, 2020.
55. Chauffaille, M.L.L.F, et al. Manejo da LLC na era pós-molecular. *Revista Médica* 4. 2016
56. Fries, K.L.; Miller, W.E.; Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol*. 70(12):8653-8659, 1996.
57. Li, Z.; Chen, X.; Li, L, et al. EBV encoded miR-BHRF1-1 potentiates viral lytic replication by downregulating host p53 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol*. 44(2):275-279, 2012.