

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

**FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS NA PATOGÊNESE,  
CONSTITUIÇÃO DO MICROAMBIENTE TUMORAL E PROGNÓSTICO  
CLÍNICO DO LINFOMA DE HODGKIN PEDIÁTRICO**

**MÁRIO HENRIQUE MAGALHÃES BARROS**

2011

Fatores Genéticos e Ambientais na Patogênese, Constituição do Microambiente Tumoral e Prognóstico Clínico do Linfoma de Hodgkin Pediátrico

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Oncologia.

**Aluno:**

Mário Henrique Magalhães Barros

**Orientador:**

Dra. Rocio Hassan

**Co-Orientadores:**

Dra. Ilana Zalcborg

Prof. Dr. Gerald Niedobitek

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Mário Henrique Magalhães Barros

Fatores Genéticos e Ambientais na Patogênese, Constituição do Microambiente  
Tumoral e Prognóstico Clínico do Linfoma de Hodgkin Pediátrico

Aprovada em:

---

Profa. Dra. Adriana Bonomo (Presidente)

---

Prof. Dr. Fernando A. Soares

---

Prof. Dr. José Vasallo

---

Prof. Dr. Mário Nucci

---

Prof. Dr. Roberto Arcuri

---

Prof. Dr. Cláudio Gustavo Stefanoff

Rio de Janeiro, 24 de março de 2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

B268f      Barros, Mário Henrique Magalhães.

Fatores Genéticos e Ambientais na Patogênese, Constituição do Microambiente Tumoral e Prognóstico Clínico do Linfoma de Hodgkin Pediátrico. / Mário Henrique Magalhães Barros. – Rio de Janeiro: INCA, 2011.

192 f.; il. color.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia-Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2007. Orientadores: Rocio Hassan; Gerald Niedobitek.

1. Doença de Hodgkin. 2. Linfoma. 3. Vírus Epstein-Barr. I. Hassan, Rocio. II. Niedobitek, G. III. Instituto Nacional do Câncer. IV. Título.

CDD 618.92994

“Deus faz e o vento junta”

(Provérbio argentino)

“Nichts ist erledigt”

(Autor desconhecido)

"Alguns não conseguem afrouxar suas  
próprias cadeias e, não obstante,  
conseguem libertar seus amigos.

Você tem que estar preparado para se  
queimar em sua própria chama: como se  
renovar sem primeiro se tornar cinzas?

- Assim falou Zaratustra”

(Friedrich Nietzsche)

## **AGRADECIMENTOS**

À Rocio Hassan por todos estes anos de ensino, amizade, paixão pela ciência e amparo nos momentos difíceis. Por sempre ter acreditado na minha capacidade e sempre ter me incentivado a me superar dia-a-dia. As palavras são insuficientes para demonstrar toda a minha gratidão e admiração.

Ao Gerald Niedobitek pela confiança, aprendizado e incentivo nestes 11 meses em Berlim.

À Ilana Zalcborg por sempre ter acreditado e apostado nos meus sonhos.

Ao programa de Pós-Graduação em Oncologia do Instituto Nacional do Câncer e ao CEMO, pela oportunidade em desenvolver este estudo.

A Maria Carolina (Carolzinha) pela ajuda com os polimorfismos da IL-10, amizade, carinho e companhia nesta e em tantas outras caminhadas.

A Marina (Marininha) pela amizade, carinho e apoio em todos estes anos.

A Maria Gabriela (Gabi) pela ajuda com as questões administrativas da “reta final”.

Ao Tarssyo pela ajuda com os polimorfismos do CTLA4.

A Vanessa, Gustavo, Adelaide, Victor, Paola, Virgínia, Telma e Priscila, amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO, pelo companheirismo ao longo destes anos.

A Elsa e Luciana que mesmo distante continuam com o mesma a amizade e carinho.

Aos amigos do Unfallkrankenhaus Berlin, Pamela, Anka, Katia, Bine, Gabriela, Johannes, Patricia e Nadine pela acolhida e amizade durante minha estadia em Berlim.

Ao Dr. Fernando Soares do departamento de patologia do Hospital A.C. Camargo (São Paulo) pela contribuição dispensada neste e em tantos outros estudos.

Ao Javier por toda a amizade, ajuda, companheirismo e paciência nestes últimos quatro anos.

Ao Stephan por toda ajuda incondicional e companheirismo neste último ano em Berlim.

A minha família que me apóia a cada passo dado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O linfoma de Hodgkin clássico (LHc) é caracterizado pelo pequeno número de células de Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS) em meio a um fundo de células não neoplásicas, principalmente T e B. Este microambiente tumoral tem sido considerado uma manifestação imune do hospedeiro contra as células H-RS. Uma vez que crianças e adultos apresentam diferenças quanto a constituição e funcionalidade do sistema imune, além de eventos patogênicos distintos, é de se esperar que o microambiente tumoral no LHc exiba diferenças entre crianças e adultos. Neste estudo, nós analisamos uma série de casos de LHc (100 casos) em relação às características clínico-histológicas, composição do microambiente tumoral através da imunomarcagem para CD3, CD4, C-maf, T-bet, FoxP3, CD8, Tia-1, Granzima B (GrB) e CD20, além do impacto prognóstico destas características. O índice de proliferação celular (IPC) das células neoplásicas e benignas foi determinado a partir da imunoeexpressão de Ki67. Os polimorfismos de base única (SNPs) da IL10 -1082A/G, -819C/T e -592C/A foram determinados através de PCR alelo-específica. Os SNPs de CTLA4 -1722 A/G, +49 A/G e CT60 A/G foram determinados por discriminação alélica. O vírus Epstein-Barr (EBV) foi determinado por hibridização *in situ* (EBER-ISH) e imunomarcagem para LMP1. A idade ao diagnóstico variou de 3 a 18 anos (mediana 14 anos) com 27% dos casos  $\leq 10$  anos. A idade e o subtipo histológico não mostraram os padrões típicos para o LHc pediátrico: um pico precoce de casos não foi observado, tendo a maioria dos casos  $>10$  anos ao diagnóstico. A esclerose nodular (EN) foi o subtipo mais freqüente (69%), sendo comum nas crianças  $>10$  anos, seguida da celularidade mista (CM, 23%), distribuída igualmente entre os grupos etários. 44,8% dos casos foram EBV+, sem associação com os grupos etários ( $\leq 10$  anos vs.  $>10$  anos). Os casos de CM estavam independentemente associados ao EBV ( $p=0,045$ ) e à relação CD4/CD20  $<1$  no microambiente tumoral ( $p=0,014$ ). As populações linfocitárias estiveram associadas aos grupos etários, havendo um perfil citotóxico em idades precoces e um perfil supressivo em idades maiores. O EBV influenciou a composição linfocitária com mais células CD8+, Tia-1+, GrB+ e T-bet+. Doença extranodal ( $p=0,016$ ) e linfócitos GrB+  $>4/\text{mm}^2$  ( $p=0,045$ ) estiveram independentemente associados a pior sobrevida livre de eventos (SLE). Um escore prognóstico foi construído e permitiu a separação dos casos em 3 grupos com diferenças na SLE ( $p=0,005$ ). Os genótipos da IL10 -1082GG e -592CC e o haplótipo GCC estiveram associados a características histológicas, baixo número de linfócitos Th2 e alto número de células T reguladoras (Tregs). O genótipo do CTLA4 CT60GG foi associado ao maior IPC das células H-RS. O SNP CT60A e o haplótipo +49A/CT60A estiveram relacionados ao maior número de linfócitos CD4+, enquanto o SNP CT60G e o genótipo cT60GG estiveram associados ao maior número de linfócitos CD8+ e Tregs. O haplótipo CTLA4 +49G/CT0G foi independentemente associado a pior SLE ( $p=0,036$ ). Em conclusão: 1) O LHc pediátrico no sudeste do Brasil deve ter um padrão epidemiológico intermediário entre o LHc pediátrico visto nas regiões menos e mais desenvolvidas. A histopatogênese da CM deve ser resultante de uma exposição precoce ao EBV num contexto de déficit imune, refletido pela razão CD4/CD20  $<1$  no microambiente tumoral; 2) Este é o 1º estudo a descrever a composição do microambiente tumoral no LHc pediátrico e a determinar que os SNPs da IL10 e CTLA4 são capazes de influenciar a composição do microambiente tumoral no LHc; e 3) O EBV tem uma influência significativa na composição do microambiente tumoral e na modulação da resposta imune contra o tumor.

## ABSTRACT

Classical Hodgkin lymphoma (cHL) is characterized by a small number of neoplastic, Hodgkin and Reed-Sternberg (H-RS) cells in a background of non-neoplastic, mainly B and T cells. This tumor microenvironment has been considered to be a manifestation of host immune reactions to malignant cells. Since children and adults have difference in the constitution and functionality of the immune system, and pathogenic events differ in pediatric and adult cHL, it is likely that the tumor microenvironment in cHL may be distinct in the pediatric setting. In this study, we analyzed a series of pediatric cHL (100 cases) regarding the clinical and histological characteristics, as well as composition of the tumor microenvironment by CD3, CD4, C-maf, T-bet, FoxP3, CD8, Tia-1, Granzyme B (GrB) and CD20 immunostain and its prognostic impact. Proliferation index of neoplastic and benign infiltrating cells was determined by Ki67 immunostain. We determined also the IL10 -1082A/G, -819C/T and -592C/A genotype of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and haplotypes by Allele-specific (AS) PCR and CTLA4 -1722 A/G, +49 A/G and CT60 A/G SNPs by allele discrimination with fluorogenic hydrolysis probes (Taqman® Applied Biosystems). Epstein-Barr virus (EBV) was determined by in situ hybridization (EBERs-ISH) and LMP1 immunostain. Age at diagnosis ranged from 3 to 18 years (median 14) with 27% of cases  $\leq 10$  years. Age and histologic subtype did not conform to the expected pattern for childhood cHL, an early childhood peak was not observed, with most cases occurring in the  $>10$  years age group. Nodular sclerosis (NS) was the most frequent subtype (69%) and was more frequent in the  $>10$  years age group, followed by mixed cellularity (MC, 23%) which was distributed equally between age groups. EBV was identified in 44.8% of cases, without preferential association with age groups ( $\leq 10$  years vs.  $>10$  years). MC cases were independently associated with EBV ( $P= 0.045$ ) and with a CD4/CD20 ratio  $<1$  in the microenvironment ( $P= 0.014$ ). Lymphocyte subsets in the microenvironment were associated with age-group ( $\leq 10$  vs.  $>10$ ) exhibiting a shift from more cytotoxic to more suppressive profile along with age. EBV influenced the lymphocyte composition with more CD8+, Tia-1+, GrB+, and T-bet+ (Th1) cells. Extranodal disease ( $P= 0.016$ ) and GrB+ lymphocytes  $>4$  cells/mm<sup>2</sup> ( $P= 0.045$ ) were independently associated with worst event-free survival (EFS). A prognostic score was constructed and allowed to segregate the children in 3 groups with differences in EFS ( $P= 0.005$ ). IL10 genotypes -1082GG and -592CC and haplotype GCC associated with histological characteristics, low number of Th2 and high number of regulatory T (Treg) cells. CTLA4 CT60GG genotype was associated with high H-RS proliferative index (Ki67 $>50\%$ ). The SNP CT60A and haplotype +49A/CT60A were related with high number of CD4+ T cells, while the SNP CT60G and the genotype CT60GG were associated with high number of CD8+ and Treg cells. The CTLA4 haplotype +49G/CT60G was independently associated with worst EFS ( $p= 0.036$ ). In conclusion: 1) Pediatric cHL in Southeastern Brazil may have an intermediate epidemiological situation between childhood cHL in underdeveloped and developed regions. Histopathogenesis of MC subtype may result from early exposure to EBV in the context of an impaired immune system reflected by a CD4/CD20 ratio  $<1$ ; 2) This the 1<sup>st</sup> study to describe the specific characteristics of tumor microenvironment composition in pediatric cHL and to determine that IL10 and CTLA4 SNPs are able to influence the tumor microenvironment composition in cHL; and 3) EBV-status has a significant influence in the tumor microenvironment composition and likely in the modulation of the immune response against the tumor.

## LISTA DE FIGURAS

		Pag.
<b>Figura 2.1</b>	Modelo de patogênese do linfoma de Hodgkin associado ao vírus Epstein-Barr	34
<b>Figura 2.2</b>	Representação esquemática da produção de IL-10 por células tumorais e seus efeitos em células do sistema imune e na resposta inflamatória	43
<b>Figura 5.1</b>	Distribuição etária dos casos incluídos no estudo. Número de casos por idade	76
<b>Figura 5.2</b>	Variabilidade histológicas observada nos casos estudados	80
<b>Figura 5.3</b>	Distribuição do número de células neoplásicas e do número de eosinófilos no microambiente tumoral por 10 campos de grande aumento, em relação à presença de granuloma	81
<b>Figura 5.4</b>	Avaliação da expressão de proteínas e RNA para determinação do fenótipo celular e associação com EBV, por imunohistoquímica e hibridização in situ	83
<b>Figura 5.5</b>	Sobrevida global e sobrevida livre de eventos nos 94 casos de linfoma de Hodgkin clássico analisáveis	85
<b>Figura 5.6</b>	Gráfico de tipo “Box plot” mostrando a distribuição das subpopulações linfocitárias do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico pediátrico	88
<b>Figura 5.7</b>	Caracterização dos linfócitos do microambiente tumoral do LHc pediátrico – parte I	89
<b>Figura 5.8</b>	Caracterização dos linfócitos do microambiente tumoral do LHc pediátrico – parte II	90
<b>Figura 5.9</b>	Distribuição das sub-populações linfocitárias do microambiente tumoral quanto aos grupos etários do LHc pediátrico	96
<b>Figura 5.10</b>	Correlação entre idade o número de linfócitos CD3+, T-bet+, CD8+ e CD20+	97
<b>Figura 5.11</b>	Distribuição do número de linfócitos CD4+ /mm <sup>2</sup> em relação aos grupos etários	97

<b>Figura 5.12</b>	Exemplos de dupla marcação para Granzima B (castanho) e FoxP3 (vermelho)	98
<b>Figura 5.13</b>	Gráficos de dispersão, mostrando as correlações diretas entre o número de linfócitos benignos Ki67+ e o número de linfócitos FoxP3+, CD8+, Tia-1+, Granzima B+, T-bet+ e C-maf+	101
<b>Figura 5.14</b>	Linfócitos Ki67+	102
<b>Figura 5.15</b>	Sobrevida livre de eventos no linfoma de Hodgkin clássico em relação à presença da doença extranodal, leucopenia e o estatus de associação com o vírus Epstein-Barr	108
<b>Figura 5.16</b>	Sobrevida livre de eventos das variáveis histológicas e imunofenotípicas associadas a características histológicas e imunológicas do microambiente tumoral no LHc pediátrico	109
<b>Figura 5.17</b>	Sobrevida livre de eventos do linfoma de Hodgkin clássico com a utilização de escore prognóstico combinando a presença de doença extranodal com número de células Granzima B+	111
<b>Figura 5.18</b>	Análise do ciclo celular mediante avaliação de expressão protéica por IHQ	116
<b>Figura 5.19</b>	Distribuição do número de células neoplásicas em mitose por 10 campos de grande aumento (CGA) em relação à positividade de p21	117
<b>Figura 5.20</b>	Gráficos do tipo “Box plot” mostrando associações do “cross-talk” entre células neoplásicas e microambiente tumoral	119
<b>Figura 5.21</b>	Dendograma obtido por agrupamento hierárquico das variáveis obtidas das células neoplásicas e do microambiente tumoral dos casos de LHc pediátricos analisados	120
<b>Figura 5.22</b>	Detecção dos genótipos da posição -1082 da IL-10 em homo e heterozigose, por AS-PCRs	123
<b>Figura 5.23</b>	Detecção dos genótipos da posição -592 da IL10 em homo e heterozigose, por AS-PCRs	
<b>Figura 5.24</b>	Distribuição do número de linfócitos Th2 pelo SNP -1082	128

<b>Figura 5.25</b>	Distribuição do número de linfócitos CD3 pelo SNP -592	129
<b>Figura 5.26</b>	Distribuição do número de linfócitos CD8 pelo SNP -592	130
<b>Figura 5.27</b>	Distribuição do número de linfócitos C-maf+ pelo SNP -592	130
<b>Figura 5.28</b>	Gráfico de discriminação alélica do gene CTLA-4, posição CT60	132
<b>Figura 5.29</b>	Relação entre o alelo +49G do gene CTLA-4 e o número de linfócitos CD4+ /mm <sup>2</sup>	135
<b>Figura 5.30</b>	Relação entre a presença do genótipo CT60AA e o número de linfócitos FoxP3+ /mm <sup>2</sup>	137
<b>Figura 5.31</b>	Sobrevida livre de eventos em relação à presença ou a ausência do genótipo +49AA e haplótipo +49G/CT60G do gene CTLA-4	138
<b>Figura 6.1</b>	Modelo de interação entre os polimorfismos da região próxima de IL10 e os linfócitos do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico	164

## LISTA DE TABELAS

		Pag.
<b>Tabela 2.1</b>	Padrões de latência do vírus Epstein-Barr nas diferentes neoplasias	32
<b>Tabela 4.1</b>	Valor de referência dos exames laboratoriais analisados	54
<b>Tabela 4.2</b>	Descrição dos anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico da caracterização das células neoplásicas, em relação às questões técnicas do produto, tipo de marcação e critérios de positividade	63
<b>Tabela 4.3</b>	Anticorpos utilizados na caracterização imunohistoquímica das células inflamatórias do microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin. Descrição das questões técnicas referentes ao produto e o tipo de marcação esperada	64
<b>Tabela 5.1</b>	Dados clínico-laboratoriais do grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico	78
<b>Tabela 5.2</b>	Descrição dos subtipos histológicos, subtipos da esclerose nodular, grau da esclerose nodular e padrão interfolicular nos casos de linfoma de Hodgkin clássico analisados	81
<b>Tabela 5.3</b>	Imunoexpressão de CD30, CD15, CD20 e presença do vírus Epstein-Barr nas células neoplásicas do linfoma de Hodgkin clássico	82
<b>Tabela 5.4</b>	Características clínicas e histológicas do linfoma de Hodgkin clássico pediátrico de acordo com a associação com o vírus Epstein-Barr e o subtipo histológico celularidade mista	87
<b>Tabela 5.5</b>	Descrição da população de linfócitos do microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin clássico na infância, neste estudo	91
<b>Tabela 5.6</b>	Análise multivariada das características biológicas associadas estatisticamente com o número de linfócitos do microambiente tumoral	99
<b>Tabela 5.7</b>	Análise multivariada das características histológicas e virais associadas, na análise univariada, com o número de linfócitos do microambiente tumoral	104

<b>Tabela 5.8</b>	Sumário das características clínicas, histológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr ao diagnóstico e a sobrevida livre de eventos nos casos de linfoma de Hodgkin clássico	106
<b>Tabela 5.9</b>	Regressão de Cox das variáveis clínicas, histológicas e imunohistoquímicas associadas estatisticamente à sobrevida livre de eventos	110
<b>Tabela 5.10</b>	Descrição do número de eventos na sobrevida livre de eventos de acordo com o escore prognóstico proposto	110
<b>Tabela 5.11</b>	Associação diferencial de características histopatológicas e composição do microambiente tumoral com a sobrevida livre de eventos, de acordo ao estatus de associação com o vírus Epstein-Barr	112
<b>Tabela 5.12</b>	Regressão de Cox das variáveis estatisticamente significantes na sobrevida livre de eventos do linfoma de Hodgkin clássico não associado ao vírus Epstein-Barr	113
<b>Tabela 5.13</b>	Associação do balanço do número de células neoplásicas uninucleadas (NUN) e multinucleadas (NMN) com o nível de linfócitos Granzima B+ e o balanço entre o número de linfócitos CD4+/CD20+	118
<b>Tabela 5.14</b>	Análise multivariada entre as variáveis referentes às células neoplásicas e as variáveis referentes ao microambiente tumoral	122
<b>Tabela 5.15</b>	Freqüência genotípica dos SNPs -1082 (G/A) e -592 (A/C), e dos haplótipos proximais do promotor do gene da IL-10	124
<b>Tabela 5.16</b>	Associação dos SNPs da posição -1082 em homozigose do gene da IL10 com o balanço entre as células neoplásicas multinucleadas e as células neoplásicas uninucleadas e o padrão interfolicular	126
<b>Tabela 5.17</b>	Associação do haplótipo proximal GCC com o grau e o risco da esclerose nodular	126
<b>Tabela 5.18</b>	Freqüência genotípica dos SNPs -1722 (A/G), +49 (A/G) e CT60 (A/G) do gene CTLA-4	133

<b>Tabela 5.19</b>	Freqüência dos haplótipos mais comuns do gene CTLA4 em relação aos polimorfismos das regiões +49 e CT60	133
<b>Tabela 5.20</b>	Principais associações significativas entre os genótipos da posição +49 e CT60 do gene CTLA-4 com características do linfoma de Hodgkin clássico	136
<b>Tabela 5.21</b>	Principais associações entre os haplótipos formados pelos alelos da posição +49 e CT60 do gene CTLA-4 com características do linfoma de Hodgkin clássico	137
<b>Tabela 5.22</b>	Regressão de Cox das variáveis clínicas, histológicas e genéticas associadas estatisticamente com a sobrevida livre de eventos	139

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

µM: Micromolar

ABVD: Adriplastina, Bleomicina, Vincristina e DTIC

AS-PCR: Reação em cadeia da polimerase alelo-específica (do inglês, *allele specific polymerase chain reaction*)

BCR: Receptor de células B (do inglês, *B-cell receptor*)

pb: Pares de base

Ca: Cálcio

CD, célula: Célula dendrítica

Células HRS: Células de Hodgkin e Reed-Sternberg

CEMO: Centro de Transplante de Medula Óssea

CGA: Campo de grande aumento

CM: Celularidade mista

COPP: Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina e Prednisona

CTLA-4: antígeno 4 do linfócito T citotóxico (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte antigen*)

DHL: Desidrogenase láctica

DIPAT: Departamento Integrado de Anatomia Patológica.

DL: Depleção linfocitária

EBER: Pequeno RNA viral do Epstein-Barr (do inglês, *Epstein-Barr viral small RNA*)

EBNA: Antígeno nuclear viral do Epstein-Barr (do inglês, *Epstein-Barr viral nuclear antigen*)

EBV: Vírus Epstein-Barr

EN: Esclerose nodular

EN-AR: Esclerose nodular de alto risco

EN-BR: Esclerose nodular de baixo risco

Eo: Eosinófilo

EUA: Estados Unidos da América

FIP: Fixado e incluído em parafina

GCT<sub>h</sub>, célula: célula T auxiliar do centro germinativo (do inglês, *germinative center T help cell*)

HE: Hematoxilina e eosina.

IFN: Interferon

Ig: Imunoglobulina

IISS: Intervalo entre o início dos sinais/sintomas

IL: Interleucina

IL-10<sub>v</sub>: Interleucina-10 viral

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IPC: Índice de proliferação celular

IPS: Escore Prognóstico Internacional (do inglês, *International Prognostic Score*)

ISH: Hibridização *in situ*

LB: Linfoma de Burkitt

LH: Linfoma de Hodgkin

LHc: Linfoma de Hodgkin clássico

L&H, célula: Células Reed-Sternberg variante linfocítica e/ou histiocítica

LHPLN: Linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular

LIF: Fator Inibidor Leucêmico (do inglês, *leukemia inhibitory factor*)

LMP: Proteína latente de membrana (do inglês, *Latent membrane protein*).

LT: Linfotóxina

LTC: Linfócito T citotóxico

mM: Milimolar

NK, célula: Célula natural killer

NMN: Neoplásica multinucleada (célula)

NUN: Neoplásica uninucleada (célula)

OEPA: Vincristina, Etoposide, Prednisona e Adriblastina

OMS: Organização Mundial de Saúde.

OPPA: Vincristina, Procarbazina, Prednisona e Adriblastina

PC: Proliferação celular

PCR: Reação em cadeia de polimerase.

PDGF: Fator de crescimento derivado das plaquetas (do inglês, *platelet-derived growth factor*)

RPM: Rotações por minuto

SAA: Sítios anatômicos acometidos

sCTLA-4: CTLA-4 secretado

SLD: Sobrevida livre de doença

SLE: Sobrevida livre de eventos

SG: Sobrevida global

SNP: Polimorfismo de um nucleotídeo simples (do inglês, *single nucleotide polymorphism*)

SUS: Sistema Único de Saúde

TCR: Receptor de células T

TGF: Fator de crescimento tumoral (do inglês, *transforming growth factor*)

Th, linfócito: Linfócito T auxiliar (do inglês, *T help lymphocyte*)

TMA: *Tissue Micro-Array*

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral

Treg, célula: Célula T regulatória

VSH: Velocidade de eritrossedimentação

## SUMÁRIO

	Pag.	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>26</b>
2.1	Características Clínicas	26
2.2	Características Histológicas	27
2.3	Características Epidemiológicas	30
2.4	O Vírus Epstein-Barr (EBV)	31
2.5	Fatores Prognósticos Relacionados às Células Neoplásicas no Linfoma de Hodgkin Clássico	36
2.6	Microambiente Tumoral	39
2.7	A IL10 no Processo Tumorigênico	42
2.7.1	A IL10 no Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin Clássico	43
2.7.2	Os Polimorfismos da IL10	44
2.8	O gene CTLA4 como Possível Candidato à Modulação do Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin Clássico	47
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
3.1	Objetivo Geral	51
3.2	Objetivos Específicos	51
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>53</b>
4.1	Desenho do Estudo	53
4.2	População do Estudo	53
4.3	Critérios de Inclusão	53
4.4	Critérios de Exclusão	53
4.5	Dados Clínico-Epidemiológicos	54
4.6	Estudo Histológico	54
4.7	Construção do “Tissue Micro-Array” (TMA)	57
4.8	Estudo Imunohistoquímico	57
4.8.1	Procedimentos Gerais	58
4.8.2	Método de Dupla Marcação	60
4.8.3	Avaliação e Pontos de Corte	60

4.8.4	Estudo do Microambiente Tumoral e Análise Microscópica Computacional Assistida	61
4.9	Hibridização in situ para EBER-1 (EBER-ISH)	65
4.10	Extração de DNA	66
4.11	Caracterização dos Polimorfismos do Promotor do Gene IL10	68
4.11.1	Estratégia de Genotipagem	68
4.11.2	Genotipagem dos SNPs -1082 A/G e -592A/C	68
4.11.3	Controle de Genotipagem do Promotor do Gene da IL10	69
4.12	Caracterização dos Polimorfismos do Gene CTLA4	70
4.13	Eletroforese e Avaliação dos Produtos de PCR	71
4.13.1	Preparação de Géis de Agarose	71
4.13.2	Preparação e Coloração de Géis de Poliacrilamida	71
4.14	Definições de Resposta e Sobrevida	72
4.15	Análise Estatística	74
4.16	Critérios Éticos	75
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>76</b>
5.1	Características Gerais dos Casos Analisados	76
5.1.1	Características Epidemiológicas e Clínico-laboratoriais	76
5.1.2	Características Histológicas	78
5.1.3	Perfil Imunofenotípico das Células H-RS	82
5.1.4	Associação com o Vírus Epstein-Barr	82
5.1.5	Resposta ao Tratamento	84
5.2	Linfoma de Hodgkin Clássico no Rio de Janeiro: Um Padrão Epidemiológico Distinto	86
5.3	O Microambiente Tumoral no LHc Pediátrico	87
5.3.1	Subpopulações linfocitárias no microambiente tumoral	87
5.3.1.1	Linfócitos T CD3+	91
5.3.1.2	Linfócitos T CD4+	92
5.3.1.3	Linfócitos FoxP3+	92
5.3.1.4	Linfócitos T-bet+	93
5.3.1.5	Linfócitos C-maf+	93
5.3.1.6	Linfócitos CD8+	94
5.3.1.7	Linfócitos Tia-1+ e Granzima B+	94
5.3.1.8	Linfócitos CD20+	95

5.3.1.9	Linfócitos FoxP3+Granzima B+	95
5.3.1.10	Proliferação dos Linfócitos do Microambiente Tumoral	100
5.3.2	As Populações Linfocitárias estão Associadas com Características Histológicas e Estatus do EBV no LHc pediátrico	103
5.3.3	As Características do Microambiente Tumoral Estão Associadas ao Prognóstico no Linfoma de Hodgkin Clássico da Infância	105
5.3.4	Escore Prognóstico Baseado nas Características Clínicas e do Hospedeiro	110
5.3.5	O Vírus Epstein-Barr Influencia o Papel Prognóstico do Microambiente Tumoral	111
5.4	O Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin Clássico está Associado a Características de Funcionalidade do Ciclo Celular e Apoptose das Células Neoplásicas	113
5.4.1	Relação entre o Número de Linfócitos do Microambiente Tumoral e as Células Neoplásicas	117
5.4.2	Análises Multivariadas	121
5.5	Contribuições do Polimorfismo da Região Promotora da IL10 para a Biologia do LHc Pediátrico	122
5.5.1	Caracterização dos Polimorfismos	122
5.5.2	Associações do Polimorfismo da Região Promotora da IL10 com as Características Histológicas	124
5.5.3	Associações do Polimorfismo da Região Promotora da IL10 com as Características do Microambiente Tumoral	127
5.6	Contribuições do Polimorfismo do Gene CTLA-4 para a Biologia do Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico	131
5.6.1	Associação de polimorfismos de CTLA4 com características clínico-biológicas do LHc	133
5.6.2	Associação dos Polimorfismos de CTLA4 com as Características do Microambiente Tumoral no LHc	134
5.6.3	Os Polimorfismos do Gene CTLA-4 no Prognóstico do Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico	138
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>140</b>
6.1	Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico no Rio de Janeiro: Um	140

	Padrão Epidemiológico Distinto?	
6.2	O Subtipo Histológico Celularidade Mista é um Reflexo da Constituição do Microambiente Tumoral	143
6.3	O Microambiente Tumoral no Linfoma de Hodgkin Clássico tem Características Particulares na Infância	145
6.4	O Vírus Epstein-Barr Influencia as Características do Microambiente Tumoral no LHc Pediátrico	149
6.5	O Estatus Proliferativo das Células Benignas do Microambiente Tumoral Influencia a Sobrevida no Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico	150
6.6	A Combinação de Variáveis do Hospedeiro e do Tumor Prediz o Prognóstico no LHc Pediátrico	151
6.7	O Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin Clássico está Associado a Características Relativas a Funcionalidade do Ciclo Celular e Apoptose das Células Neoplásicas	152
6.8	As Características do Microambiente do Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico Podem ser Influenciadas pelos Polimorfismos da Região Promotora da IL10	158
6.9	Os polimorfismos da Região Promotora de IL10 Poderiam Influenciar a Composição Linfocitária do Microambiente Tumoral no LHc Pediátrico	160
6.10	Os polimorfismos do Gene CTLA-4 Poderiam Influenciar as Características Tumorais e do Microambiente Tumoral no Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico	165
6.11	Os Polimorfismos do Gene CTLA-4 estão Relacionadas à Resposta Terapêutica no Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico	169
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>172</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>175</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>192</b>

## 1- INTRODUÇÃO

O linfoma de Hodgkin clássico (LHc) é uma doença heterogênea tanto do ponto de vista histopatológico quanto epidemiológico e apresenta características únicas entre os linfomas, uma vez que as células neoplásicas representam entre 0,5 e 2% da massa tumoral, sendo o resto composto por células infiltrantes não tumorais e estroma.

Desde a sua descrição clínica em 1832 por Thomas Hodgkin e, do ponto de vista histológico, por Carl Sternberg (1898) e Dorothy Reed (1902)<sup>1</sup>, a natureza desta doença e a sua origem celular foi uma incógnita. Hoje, graças às técnicas de microdissecção e de biologia molecular, sabe-se que as células neoplásicas, denominadas células de Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS), são de origem linfóide, de natureza clonal, e na grande maioria das vezes derivadas de células B<sup>2</sup>.

A descoberta de que as células H-RS derivam de linfócitos B pré-apoptóticos marcou o início de uma era de pesquisas moleculares que tentam decifrar os processos etiopatogênicos desta neoplasia. Porém, sua complexa epidemiologia, particularmente em relação à variabilidade de incidência em diferentes idades, gêneros, etnias, localizações geográficas e grupos sócio-econômicos, sugere que diferentes mecanismos etiopatogênicos, incluindo diversos fatores ambientais possam estar envolvidos<sup>3-5</sup>.

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um agente etiológico reconhecido do LHc; relação que foi inicialmente baseada em evidências indiretas oriundas de estudos epidemiológicos e sorológicos e posteriormente confirmada pela demonstração do material genético clonal do vírus nas células neoplásicas<sup>5</sup>. Sua associação com o

LHc é bastante variável, dependendo da idade e do status sócio-econômico dos pacientes<sup>6-8</sup>.

Nos dias atuais, o estudo do microambiente tumoral do LH tem ganhado cada vez mais importância, sobretudo por ter se reconhecido um intenso “cross-talk” entre as células tumorais e as diferentes subpopulações de células inflamatórias recrutadas para o tumor<sup>9-10</sup>. Estas interações bidirecionais parecem ter um papel relevante tanto na manutenção das características neoplásicas das células H-RS, como na resposta imune anti-tumoral, tanto a nível microambiental como sistêmico. A descoberta de que as células imunoreguladoras têm uma representação importante dentro do “pool” de linfócitos T intratumorais, e que a proporção entre o número de células imunoreguladoras e citotóxicas está associada ao prognóstico no LHc nos adultos, de maneira diversa ao observado nos tumores sólidos<sup>11-13</sup>, tem levado a uma corrida científica para tentar entender a função destas células no microambiente tumoral do LHc, assim como os mecanismos pelos quais elas são recrutadas e/ou diferenciadas nesta neoplasia.

Atualmente, há mais questionamentos do que respostas, o que faz desta área um terreno fértil para as pesquisas científicas, sobretudo no LH pediátrico onde são quase inexistentes as pesquisas neste campo específico. Mais ainda, este tema tem maior relevância científica quando se leva em consideração que as crianças apresentam diferenças, em relação aos adultos, na composição do sistema imune tanto em relação ao número de células T e B<sup>14-17</sup>, quanto a funcionalidade das células T (“envelhecimento imune”)<sup>18-20</sup>.

O estado do conhecimento atual permite afirmar que o LHc, mais do que qualquer outra neoplasia, é uma enfermidade que tanto biologicamente quanto clinicamente está associada não apenas às alterações moleculares das células

neoplásicas, como também a respostas imunológicas locais e sistêmicas evocadas pelo hospedeiro. Assim, tanto os estudos celulares e moleculares das células H-RS, como o entendimento da forma como as células H-RS modulam e são moduladas pelo sistema imune, são essenciais para identificação de marcadores biológicos associados ao prognóstico e ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o LHc.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características Clínicas

Os linfomas são a terceira neoplasia mais prevalente da infância, representando o LH 10 à 30% de todo este total<sup>21</sup>. Nos Estados Unidos, o LH é a sexta neoplasia mais prevalente nas crianças com até 15 anos e a mais prevalente nos pacientes com até 18 anos<sup>21</sup>.

Linfadenopatia cervical é a forma de apresentação clínica mais comum. Cerca de 80% das crianças possuem envolvimento linfonodal na região de cabeça e pescoço, e 60% exibem envolvimento mediastinal. A maioria dos pacientes possui doença supradiaphragmática<sup>22</sup>. A apresentação de sintomas sistêmicos “B” como definido pelo estadiamento de Ann Arbor (febre maior que 38°C por pelo menos 3 dias consecutivos, sudorese noturna e perda de peso inexplicada maior que 10% do peso corpóreo nos últimos 6 meses) acomete de 20 à 30% dos doentes ao diagnóstico<sup>23</sup>. A prevalência desses sintomas aumenta com o estadiamento.

O estadiamento Ann Arbor<sup>23</sup> para o LH, gradua esta doença em 4 níveis de acordo com número e a localização de cadeias linfonodais envolvidas:

Comprometimento de uma única região ganglionar (I) ou comprometimento de um único órgão ou sítio extralinfático (I<sub>E</sub>);

Comprometimento de duas ou mais regiões ganglionares do mesmo lado do diafragma isoladamente (II) ou com comprometimento limitado de órgão ou tecido extralinfático contíguo (II<sub>E</sub>);

Comprometimento de regiões ganglionares em ambos os lados do diafragma (III), podendo incluir o baço (III<sub>S</sub>) e/ou comprometimento limitado de órgão ou sítio extralinfático contíguo (III<sub>E</sub>, III<sub>ES</sub>);

Focos múltiplos ou disseminados de comprometimento de um ou mais órgãos ou tecidos extralinfáticos, com ou sem comprometimento linfático (IV).

Na tentativa de se estabelecer uma terapia risco-específica, o LH é dividido em grupos de risco, combinando-se o estadiamento clínico com a presença dos sintomas “B”. Dois grandes grupos são reconhecidos pela maioria dos protocolos de tratamento: desfavorável (estadiamentos IIB, IIIB e IV) e favorável (demais estadiamentos)<sup>24</sup>.

O tratamento é baseado em quimioterapia, podendo ou não ser utilizada radioterapia. A radioterapia como tratamento exclusivo é aplicado em 10 à 15% dos pacientes, sendo bastante controversa a sua utilização no grupo pediátrico<sup>25</sup>. É utilizada na maioria dos protocolos de tratamento em pacientes com estadios avançados como consolidação da quimioterapia e nos estadios precoces apenas quando há doença residual após a quimioterapia<sup>26</sup>.

Os regimes quimioterápicos atuais são baseados na utilização de antraciclinas e agentes alquilantes em baixas doses, com respostas e sobrevida semelhantes aos antigos regimes baseados na mostarda nitrogenada<sup>26</sup>. A utilização destes protocolos tem garantido uma sobrevida livre de eventos (SLE) em 5 anos que variam entre 75 a 97%<sup>26</sup>.

## **2.2 Características Histológicas**

Segundo a nova classificação da Organização Mundial de Saúde, o linfoma de Hodgkin é composto por dois grupos distintos de doença: o linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular (LHPLN), uma entidade rara que representa cerca de 5% do total de casos de LH; e a forma “Clássica” (LHc) a qual é subclassificada em esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM), rico em

linfócitos (RL) e depleção linfocitária (DL)<sup>1</sup>. Um fator comum a ambos os grupos é que as células neoplásicas representam entre 0,5 e 10% do total de células do tecido tumoral<sup>1</sup>.

As células H-RS representam a população celular neoplásica do LHc. Estudos imunológicos e moleculares têm mostrado que estas células originam-se de células B maduras do centro germinativo (CG), apresentando os genes de imunoglobulina com hipermutação somática, indicando que o clone passou pelos processos maturativos do CG e está “bloqueado” na fase de centrocito ou pós-centrocito<sup>27-29</sup>. Entretanto, a imunoexpressão do CD20, marcador de diferenciação B, só ocorre em 20 a 30% dos casos<sup>1</sup>. A imunoexpressão do CD30 ocorre em praticamente todos os casos, já a imunoexpressão do CD15 é encontrada em 75 a 80%, mas está restrita a uma minoria das células neoplásicas<sup>1</sup>.

As células de Reed-Sternberg (RS) exibem citoplasma abundante levemente basofílico, núcleo grande quase sempre arredondado e contornado por membrana nuclear proeminente, cromatina pálida e no mínimo dois nucléolos eosinofílicos, que se localizam em lóbulos nucleares separados. Algumas células RS podem exibir citoplasma condensado e núcleo picnótico (células mumificadas). Quando as células neoplásicas perdem a lobulação nuclear, exibindo núcleo único com nucléolo eosinofílico proeminente, são chamadas de células de Hodgkin<sup>1</sup>.

Em todos os subtipos do linfoma de Hodgkin clássico, há apagamento da arquitetura linfonodal por variável número de células H-RS associadas a um rico fundo inflamatório composto por linfócitos, eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos<sup>1</sup>.

O subtipo EN compreende cerca de 70% dos casos de linfoma de Hodgkin clássico nos países desenvolvidos<sup>3</sup>. Morfologicamente, apresenta um

padrão de crescimento nodular, bandas de colágeno e células lacunares. Há um número variável de células RS, linfócitos pequenos e outras células inflamatórias não neoplásicas<sup>1</sup>. Na fase inicial, também chamada de “fase celular da esclerose nodular” ou esclerose nodular mínima, o linfonodo apresenta espessamento focal da cápsula com a emissão de uma banda colágena ao interior do linfonodo, porém sem formar um nódulo distinto<sup>1, 30-31</sup>.

O grupo britânico de estudo do LH propôs um sistema de graduação para a EN que estaria relacionado ao desfecho clínico dos pacientes<sup>32-34</sup>. No grau I, 75% ou mais dos nódulos contém escassas células H-RS num fundo inflamatório não neoplásico. Já o grau II exibe um dos seguintes aspectos: 1) mais de 25% dos nódulos com depleção reticular ou pleomórfica de linfócitos; 2) no mínimo, 80% dos nódulos com depleção linfocitária do tipo fibrohistiocítica; 3) mais de 25% dos nódulos contendo numerosas células H-RS preenchendo um campo de grande aumento<sup>1, 34</sup>. Com o tratamento poliquimioterápico atual, esta graduação perdeu impacto prognóstico<sup>35</sup>.

Von Wasielewski et al<sup>36</sup> propuseram uma nova graduação para os casos de EN, a qual estaria relacionada à sobrevida global nos estádios intermediário e avançado. Baseia-se no número de eosinófilos do microambiente tumoral, depleção dos linfócitos e atipia das células H-RS. Os casos que não mostram nenhum destes fatores são chamados de EN de baixo risco e aqueles com pelo menos um, de EN de alto risco<sup>36</sup>

A CM é o subtipo histológico mais comum nos países em desenvolvimento e em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)<sup>3, 7</sup>. Caracteriza-se por apresentar escassas células H-RS e um infiltrado inflamatório misto difuso ou vagamente nodular, sem fibrose esclerosante nodular<sup>1</sup>.

O subtipo RL exhibe escassas células H-RS, fundo nodular (mais comum) ou difuso de pequenos linfócitos, sem neutrófilos e eosinófilos<sup>1</sup>.

A DL é uma forma difusa do LHc, rico em células H-RS e/ou com diminuição do número de linfócitos não neoplásicos. Assim como a CM, apresenta maior prevalência nos países em desenvolvimento e indivíduos HIV+. Outro padrão encontrado é o de fibrose difusa com ou sem proliferação de fibroblastos e poucas células<sup>1</sup>.

A presença do padrão interfolicular pode ser encontrada na CM e na EN. Caracteristicamente, a arquitetura linfonodal está preservada e há hiperplasia folicular reativa. Geralmente, observa-se uma vaga expansão da região interfolicular secundariamente à proliferação de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos e células H-RS as quais são difíceis de serem identificadas<sup>30, 37-38</sup>. Este tipo de padrão não tem significado prognóstico<sup>39</sup> e alguns estudos sugerem que seria mais frequente nas crianças que nos adultos<sup>7, 40</sup>.

### **2.3 Características Epidemiológicas**

Um definido pico bimodal de incidência, ausente na maioria dos outros linfomas, é bem estabelecido no LH. Países em desenvolvimento apresentam o primeiro pico na infância, já nos países desenvolvidos, o primeiro pico verifica-se em adultos jovens; o segundo pico ocorre nos adultos em ambos os grupos<sup>3, 41</sup>. Ainda nos países em desenvolvimento, é observada maior prevalência de casos no sexo masculino<sup>3</sup>.

O LH possui 3 padrões epidemiológicos distintos, conforme o nível sócio-econômico<sup>42</sup>. O padrão I é observado em países pouco desenvolvidos e grupos de baixo poder sócio-econômico e se caracteriza por um pico de incidência precoce,

acometendo crianças abaixo dos 10 anos; não há um pico na terceira década de vida, observa-se um aumento gradativo de casos com o avançar da idade. Neste padrão, o tipo histológico predominante é a CM. O padrão III é visto em países desenvolvidos e grupos de elevado nível sócio-econômico, caracteriza-se por um pico de incidência na terceira década de vida e um predomínio do subtipo histológico EN. O padrão II é intermediário, com dois picos de incidência bem definidos (infância e segunda década de vida) e frequência semelhante dos subtipos CM e EN; esse padrão é característico dos países em desenvolvimento<sup>42</sup>.

#### **2.4 O Vírus Epstein-Barr (EBV)**

O EBV é um vírus linfotrópico, membro da família *Herpesviridae* que infecta assintomaticamente mais de 90% da população humana<sup>29</sup>. O EBV ingressa no organismo via o epitélio da orofaringe e infecta linfócitos B circulantes para estabelecer-se em estado de latência nas células B de memória. Sua primoinfecção ocorre em idades variáveis, dependendo das condições sócio-econômicas das populações, e embora a infecção seja quase sempre controlada ao nível subclínico, quando ocorre durante a adolescência e juventude pode ter como consequência uma doença conhecida como mononucleose infecciosa<sup>43</sup>.

Como este vírus está associado a algumas neoplasias, como o linfoma de Burkitt endêmico, carcinoma de nasofaringe, doença linfoproliferativa pós-transplante e linfoma de Hodgkin<sup>44</sup>, foi considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como carcinógeno humano do grupo I<sup>45</sup>.

A hipótese da associação entre o EBV e o LHc foi baseada nas evidências epidemiológicas de que uma história pregressa de mononucleose infecciosa aumentava em 3 vezes o risco de desenvolvimento de LHc<sup>4, 29</sup> e nas

alterações nos níveis séricos de anticorpos anti-EBV encontradas antes do desenvolvimento deste linfoma<sup>29</sup>. Com a detecção do genoma clonal do EBV nas células H-RS, pôde-se estabelecer a relação causal entre o EBV e uma fração dos caso de linfoma de Hodgkin clássico<sup>29</sup>.

O EBV possui distintos programas de expressão gênica, chamados “padrões de latência” que são encontrados nas diferentes etapas da biologia viral<sup>46</sup>. As neoplasias associadas ao EBV apresentam uma latência viral específica, relacionada com a origem celular, o estado imune do hospedeiro, e com o papel etiopatogênico do vírus na patologia<sup>29, 46</sup>.

Tabela 2.1: Padrões de latência do vírus Epstein-Barr nas diferentes neoplasias.

Tipo de Latência	Genes Expressos	Neoplasia Relacionada
I	EBERs, EBNA1	Linfoma de Burkitt
II	EBERs, EBNA1, LMP1, LMP2A	Linfoma de Hodgkin Carcinoma de Nasofaringe
III	EBERs, EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A	Doença Linfoproliferativa Pós-transplante

EBERs: RNA viral codificado pelo Epstein-Barr; EBNA: *Epstein-Barr virus nuclear antigen*; LMP: “Latent membrane protein”. Adaptado de Crawford<sup>29</sup>.

A proteína EBNA1 media o início da síntese do DNA viral, e é responsável pela segregação e manutenção do DNA viral nas células proliferantes<sup>47</sup>. A proteína LMP1 é considerada o principal oncogene viral. É um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) e se assemelha ao CD40, que é um receptor de membrana essencial para a ativação das células B<sup>29</sup>. Em contraste ao

CD40, LMP1 encontra-se ativa constitutivamente, independente da presença de um ligante e é o maior efetor das alterações celulares induzidas pelo EBV<sup>44</sup> (Figura 2.1).

Tanto CD40, quando associado ao seu ligante, quanto LMP1 ativam a transcrição do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)<sup>48</sup>. Nas células H-RS, o NF- $\kappa$ B regula a expressão de genes de citocinas, quimiocinas, apoptose, moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição<sup>49</sup>.

Além da LMP1, a proteína LMP2A encontra-se também envolvida na patogênese do LHC associado ao EBV. As células B que falham em expressar um receptor de células B (BCR) funcional entram em apoptose. A proteína LMP2A é funcionalmente equivalente ao receptor de células B (BCR) e mantém o sinal tônico necessário à sobrevivência celular, fornecendo sinais de resgate da apoptose das células B antes de completada a maturação no centro germinativo<sup>9</sup>. Assim, o resgate de células B pré-apoptóticas do centro germinativo, devido à ação conjunta das proteínas LMP1 e LMP2A, parece ser um passo crucial no processo linfomagênico do LHC<sup>50</sup> (Figura 2.1).

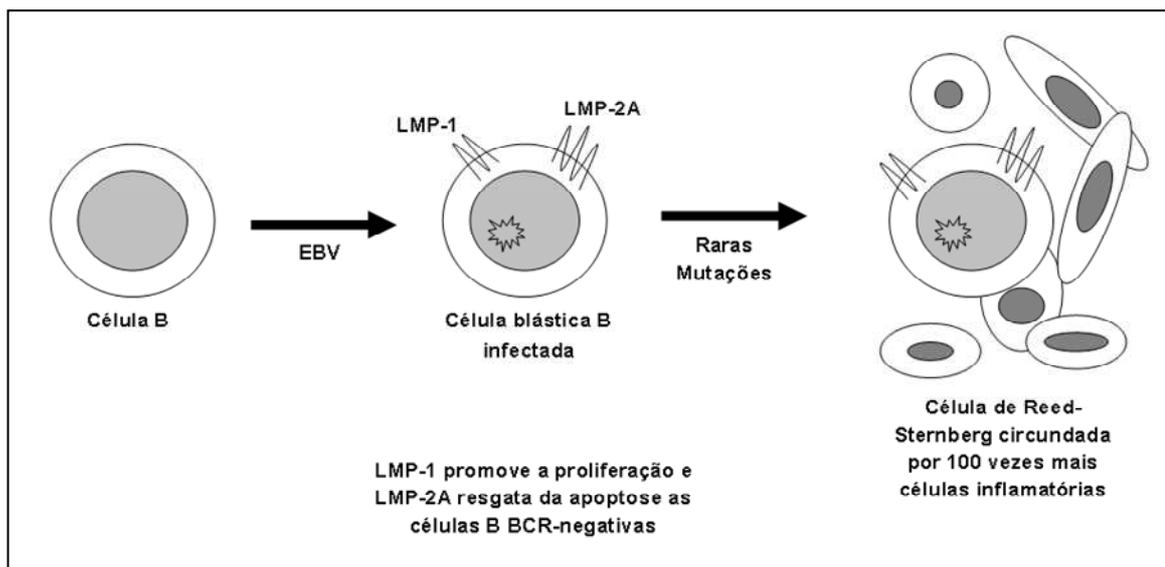


Figura 2.1: Modelo de patogênese do linfoma de Hodgkin associado ao vírus Epstein-Barr. O EBV infecta a célula B imatura antes que ela entre no centro germinativo. LMP2A consegue resgatar da apoptose aquelas células que falharam no processo de maturação e expressão das imunoglobulinas. LMP1 promove a ativação celular e passagem pelo centro germinativo, independente da coestimulação T. Mutações adicionais terminam por transformar estas células pré-apoptóticas alteradas nas células H-RS (Modificado de Hammerschmidt et al<sup>50</sup>).

A detecção do EBV nas células tumorais é comumente realizado através da detecção dos transcritos não traduzidos EBER1 e EBER2 por hibridização *in situ* (ISH) do RNA viral, no núcleo das células H-RS. Transcritos do EBER são expressos em células latentemente infectadas, num número elevado de cópias, representando o “padrão ouro” para a localização e detecção de EBV latente em células H-RS<sup>29</sup>. A imunolocalização da proteína LMP1 nas células H-RS por imunohistoquímica é também um método utilizado para o diagnóstico do vírus em tecido parafinado. Anticorpos anti-LMP1 foram desenvolvidos comercialmente e caracteristicamente emitem forte sinal localizado tanto no citoplasma quanto na membrana citoplasmática. A reação em cadeia da polimerase (PCR) não pode ser empregada como único método no diagnóstico do EBV, devido aos resultados falso-positivos

como conseqüência da presença de linfócitos B infectados latentemente pelo vírus. Entretanto, os métodos baseados em PCR são indispensáveis para a tipificação viral, assim como para a determinação de marcadores polimórficos nos estudos de epidemiologia molecular<sup>51</sup>.

Nos países em desenvolvimento, a infecção pelo EBV ocorre muito precocemente na infância, em geral estima-se que 90% das crianças já foram infectadas pelo EBV até os 9 anos de idade<sup>52-53</sup>. Em países desenvolvidos, a associação do EBV com o LHc em adultos varia de 30 à 50%. Em contraste, a prevalência do EBV em células H-RS nos países em desenvolvimento é extremamente elevada, sugerindo que o EBV possa ter um complexo papel na etiologia do LHc, talvez associado a fatores ambientais e genéticos<sup>54-55</sup>.

Estudos em países não industrializados mostram uma forte correlação entre o pico de incidência etária das crianças com o linfoma de Hodgkin e a infecção pelo EBV. Exemplos incluem: Honduras (100%), China (100%), Brasil (77%), México (65%) e Malásia (93%)<sup>56</sup>.

Vários estudos têm tentado estabelecer uma relação entre a positividade para o EBV e o subtipo histológico do linfoma de Hodgkin na faixa etária pediátrica. Alguns estudos mostram um predomínio de positividade nos casos de CM<sup>55, 57-58</sup> independente do nível sócio-econômico; outros mostram um predomínio nos casos de CM nos países em desenvolvimento, enquanto nos países desenvolvidos o predomínio da positividade é nos casos de EN (45 à 100% dos casos)<sup>55-56</sup>. Em geral, considera-se que as crianças com até 10 anos exibem uma maior frequência de associação do EBV com o LHc<sup>59</sup>.

No Brasil, os estudos referentes à prevalência do EBV no LHc pediátrico que retratem de forma fidedigna a realidade regional são escassos. Na Bahia, 87%

dos casos de linfoma de Hodgkin em crianças de até 14 anos estão associados ao EBV, sendo a CM o subtipo histológico mais freqüente<sup>60</sup>. Esta prevalência é semelhante a do EBV no linfoma de Burkitt, também na mesma região (87%) e no mesmo grupo etário<sup>60</sup>.

No Rio de Janeiro, a freqüência de associação entre o EBV e o LHc na população pediátrica, semelhante ao que ocorre com o linfoma de Burkitt, é inferior à encontrada na Bahia<sup>8, 61</sup>, representando 40-50% dos casos<sup>62</sup>.

## **2.5 Fatores Prognósticos Relacionados às Células Neoplásicas no Linfoma de Hodgkin Clássico**

Os fatores prognósticos no LHc estão baseados diretamente na carga e/ou atividade tumoral como o estadiamento, o número de linfonodos acometidos, “bulky disease” e sintomas B. Medidas indiretas da carga e atividade tumoral são baseadas em parâmetros laboratoriais: hemoglobina, nível de albumina, velocidade de eritrosedimentação, nível de lactato-desidrogenase (DHL), nível  $\beta$ -microglobulina e nível sérico de IL10<sup>1, 63-65</sup>.

Vários fatores relacionados à biologia do linfoma de Hodgkin estão sendo investigados na tentativa de aumentar a predição do desfecho clínico, permitir a utilização de terapias adaptadas a risco e criar bases racionais para estudos clínicos. Algumas características morfológicas poderiam ser reflexo fidedigno da carga tumoral, como o número de células H-RS e a fração mitótica destas células<sup>66</sup>, porém estas variáveis foram pouco exploradas, particularmente no LHc pediátrico.

Com a introdução da imunohistoquímica na prática histológica, foi possível determinar alterações na maquinaria do ciclo celular e apoptótica das células H-RS<sup>67-68</sup>. As células H-RS exibem alterações nas principais vias do ciclo

celular, assim como alterações nos principais pontos de checagem deste ciclo, estando algumas destas alterações relacionadas a resposta ao tratamento<sup>68</sup>.

De maneira característica, as células H-RS apresentam um programa de diferenciação B defeitivo, perdendo a capacidade de expressar o BCR. Nas células normais, isto teria como consequência o fenômeno de apoptose<sup>9</sup>; entretanto, as células H-RS escapam da apoptose e são capazes de proliferar<sup>9</sup>. No entanto, defeitos ainda não bem identificados no controle do ciclo celular ocasionam mitoses abortivas e endorreduplicação do material genético, levando à poliploidia e multinucleação. Isto pode explicar o pequeno número de células neoplásicas no linfonodo e a presença de várias células RS multinucleadas<sup>69-70</sup>.

Muitos grupos tentaram estabelecer o valor prognóstico do imunofenótipo das células H-RS<sup>65, 71-72</sup>. Os resultados são controversos, com a presença do impacto prognóstico em alguns estudos e ausência em outros; sendo CD20 e CD15 os marcadores mais investigados<sup>71-75</sup>.

A ativação constitutiva do fator de transcrição NF-kB que funciona como um importante sinal de sobrevivência para as células H-RS é um evento comum no LHc<sup>5</sup>. Esta ativação não parece influenciar o prognóstico dos pacientes, contribuindo essencialmente na patogênese da doença<sup>76</sup>.

Mesmo com grandes alterações na maquinaria do ciclo celular<sup>48, 67</sup>, mutações do p53 são significativamente menores no LHc do que em outras neoplasias<sup>77-78</sup>. A positividade do p53 no linfoma de Hodgkin pode variar de 29,5% a 92,85%<sup>68, 76, 79</sup> e o prognóstico desta expressão é controverso, principalmente devido a ausência de um ponto de corte padronizado para a distinção entre casos positivos e negativos<sup>76, 80</sup>.

A imunexpressão de Bcl2 pelas células H-RS tem sido alvo de vários estudos a fim de elucidar se a presença desta proteína anti-apoptótica poderia influenciar a sobrevida no LHc<sup>81-86</sup>, mas os resultados são contraditórios. Em alguns estudos, a imunexpressão de Bcl-2 pelas células neoplásicas confere pior sobrevida<sup>81, 85-86</sup>, enquanto em outros, não há diferenças na resposta ao tratamento<sup>82-84</sup>.

É possível que a combinação de marcadores relacionados ao funcionamento do ciclo celular e a capacidade de morte celular possam ser mais hábeis no delineamento prognóstico dos pacientes com LHc. Neste sentido, Montalbán et al<sup>76</sup> mostraram que a expressão pelas células H-RS de p53, Bcl2 e apoptose (TUNEL) poderia ser agrupada num escore prognóstico capaz definir grupos de risco biológicos com diferenças na sobrevida<sup>76</sup>.

Recentemente, vários estudos têm focado no nível de citocinas séricas ao diagnóstico, como o alto nível sérico de interleucina (IL) 10<sup>87-90</sup>, IL6<sup>87</sup> e TNF<sup>87</sup> como fator prognóstico no LHc. Porém, não está claro se a principal fonte destas citocinas são as células neoplásicas ou as células do microambiente tumoral, desta forma, os níveis elevados poderiam refletir uma maior carga tumoral ou um maior processo inflamatório, reflexo de uma doença mais agressiva.

O EBV parece ter um importante papel na patogênese do LHc pediátrico, porém seu papel prognóstico é bastante controverso. Claviez et al, com a maior série pediátrica já publicada em uma região de elevado nível sócio-econômico (onde a primo-infecção com EBV ocorre tardiamente e a associação do EBV ao LHc é baixa) mostraram que o EBV não está associado a melhor sobrevida livre de doença (SLD)<sup>59</sup>.

## 2.6 Microambiente Tumoral

A composição do microambiente tumoral no LHc é bastante heterogênea e consiste de linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos, células estromais e fibroblastos. A frequência de cada uma destas células varia com o subtipo histológico. A quantidade de eosinófilos depende da liberação de citocinas eosinofílicas, IL5<sup>91-92</sup>, IL9<sup>92</sup> e CCL28<sup>93</sup> pelas células H-RS e eotaxina (CCL11) pelos fibroblastos<sup>5, 94</sup>. Alguns estudos mostram que o infiltrado eosinofílico parece exibir relevância prognóstica nos casos de esclerose nodular<sup>36, 92</sup>.

O microambiente tumoral tem sido considerado como uma manifestação imune do hospedeiro às células neoplásicas<sup>77</sup>. A resposta imune no LHc é inadequada, provavelmente em consequência da baixa imunogenicidade das células H-RS, do efeito imunossupressor das células tumorais, ou de uma resposta imune inadequada<sup>95-96</sup>. Sendo as células H-RS apresentadoras de antígeno, entende-se que a formação e manutenção do microambiente tumoral do LHc são mediadas por alguns tipos de processos imunes, que se refletem no número de células infiltrantes, subtipo e status de ativação em relação à reatividade anti-tumoral, especialmente os linfócitos T citotóxicos (LTC) e as células T reguladoras (Treg)<sup>11, 96-99</sup>. No LHc, os linfócitos T CD4+ representam a maior população de células infiltrantes não tumorais, sendo as células Treg um importante subgrupo destas, recrutadas para o microambiente tumoral pelas células H-RS<sup>69, 95</sup>. In vitro, as células Treg podem inibir a produção de IL2 e a hiperexpressão da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL2 (CD25), levando ao retardo ou bloqueio da ativação dos LTC CD8+ e das células “Natural killer” (NK) contra antígenos tumorais<sup>100</sup>. Uma vez que a ação efetora citotóxica contra as células neoplásicas é executada principalmente por estas duas populações celulares, estas propriedades imunossupressoras das células Treg são

importantes no LHc, porque contribuem para a evasão imune das células H-RS e, conseqüentemente, sua sobrevivência<sup>12</sup>.

No entanto, diferentemente dos tumores sólidos onde um excesso de células Tregs está associado a imunossupressão do microambiente tumoral e pior sobrevida<sup>101-103</sup>, no LHc é observado o oposto: casos com elevado número de LTC e baixo número de células Treg estão associados a pior sobrevida, e casos com baixo número de LTC e elevado número de células Treg estão associados a uma melhor sobrevida<sup>11-13</sup>. O completo entendimento do papel destas e de outras populações celulares do sistema imune na patogênese do LHc e a explicação para os diferentes modelos prognósticos continuam obscuros. A determinação das células Treg em todos os estudos mencionados foi realizada pela imunodeteção de FoxP3, um fator de transcrição da família "Forkhead" específico da linhagem Treg CD4+ CD25+<sup>104</sup>. Até recentemente, foi considerado que as células Treg eram as únicas células a expressar FoxP3; entretanto, alguns estudos vêm mostrando que linfócitos T ativados sem atividade supressora podem também expressar aquela proteína<sup>105-107</sup>.

Um recente estudo de Schreck et al<sup>99</sup> trouxe novas informações em relação à interrelação entre células infiltrantes no LHc, mostrando que uma baixa razão entre células Th2/Treg estava associada a um desfecho clínico adverso, sugerindo um possível papel das células Treg no controle da imunidade anti-tumoral mediada por células Th2. Esta hipótese ainda necessita de validação.

No microambiente do LHc, além das células Treg convencionais CD25+FoxP3+, encontram-se outras células imunoreguladoras chamadas de células Tr1<sup>9</sup>. É descrito ainda a existência de outro subconjunto de células T imunoregulatórias, denominadas células T auxiliares do tipo 3 (Th3), mas ainda não caracterizadas no microambiente do LH<sup>108</sup>. Todas elas inibem respostas imuno-

efetoras e são importantes no controle das respostas a antígenos externos, incluindo respostas imunológicas nos transplantes<sup>109</sup>, além de proteção contra as doenças auto-imunes<sup>110</sup>. Todas estas células partilham da capacidade de secretar IL10 e TGF $\beta$ <sup>108</sup>. Recentemente, foi descrita a existência de células T auxiliares do centro germinativo (Thcg) as quais caracteristicamente expressam PD1<sup>111</sup> conjuntamente com SAP<sup>112</sup> e poderiam estar associadas ao prognóstico no LHc<sup>113</sup>.

O papel dos macrófagos como células associadas a pior sobrevida em adultos com LHc tem sido recentemente evocado, mas controversa na literatura a melhor forma de avaliá-los<sup>114-115</sup>.

## 2.7 A IL10 no Processo Tumorigênico

A IL10 foi descrita inicialmente como uma citocina antiinflamatória produzida por linfócitos T CD4+, com diferenciação Th2, e reconhecida por inibir a produção de INF- $\gamma$  por células Th1<sup>116</sup>. Além das células T, diferentes tipos celulares são capazes de produzir IL10, principalmente monócitos, macrófagos, linfócitos B e células neoplásicas, sendo que sua produção varia nos diferentes tipos de tecido ou durante as fases da resposta imune<sup>117</sup>. Durante uma infecção, a IL10 é capaz de controlar a resposta de células Th1, NK e macrófagos, o que resulta na amenização da resposta imune<sup>118</sup>.

Em relação ao câncer, também é possível visualizar um papel dual desta interleucina (Figura 2.2). Por um lado, o efeito imunossupressor da IL10 parece estar envolvido na patogênese de neoplasias, através da inibição de macrófagos e da produção de IFN- $\gamma$ , potentes mediadores antitumorais e antivirais<sup>119</sup>. A IL10, portanto, pode contribuir para o desenvolvimento de um ambiente favorável a expansão de células neoplásicas e no potencial metastático das mesmas<sup>120</sup>.

Por outro lado, a IL10 funciona como um potente fator de crescimento e diferenciação para linfócitos B humanos<sup>121</sup>. Esta propriedade pode contribuir nas neoplasias de células B, em particular as associadas com a infecção por EBV<sup>122-123</sup>.

Os efeitos da produção tecido-específica da IL10 são variáveis nos diferentes sistemas tumorais. Além dos efeitos na angiogênese, proliferação celular e inibição de apoptose, a IL10 pode afetar diferentes aspectos da imunidade anti-tumoral<sup>118</sup>.

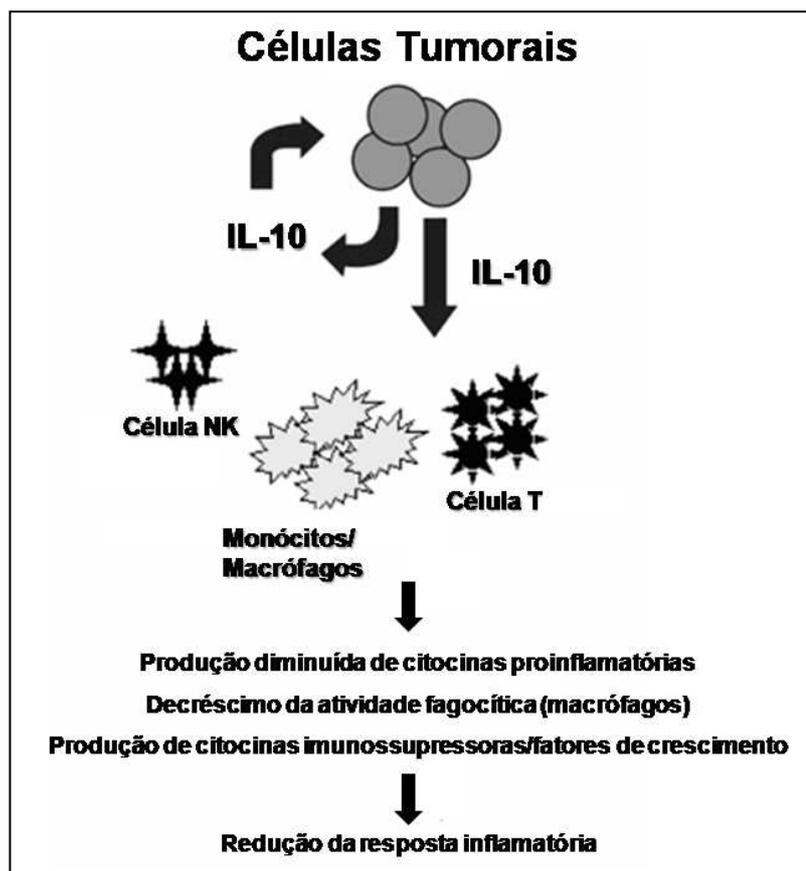


Figura 2.2: Representação esquemática da produção de IL-10 por células tumorais e seus efeitos em células do sistema imune e na resposta inflamatória. As células tumorais produzem IL10, que atua como um fator autócrino/parácrino de maneira a promover crescimento celular e induzir produção de mais IL10 para suprimir as funções de macrófagos e células T do microambiente tumoral (Adaptado de Ito et al<sup>124</sup>).

### 2.7.1 A IL10 no Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin

#### Clássico

A IL10 tem a capacidade de inibir indiretamente a produção de citocinas tanto pelas células T como pelas células NK, via inibição da função de células acessórias (macrófagos e monócitos)<sup>118</sup>. A IL10 inibe um amplo espectro de funções dos macrófagos/monócitos ativados, incluindo a produção de citocinas/quimiocinas pró inflamatórias, expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II e moléculas co-estimulatórias tais como IL12, CD80/CD86<sup>118</sup>. A IL10 pode atuar diretamente nas células T CD4, inibindo proliferação e produção de IL12 (uma

citoquina chave na diferenciação das células Th1), IFN- $\alpha$ , IL4, IL5 e IFN- $\gamma$ <sup>118</sup>. Assim, a IL10 pode diretamente regular as respostas Th1 e Th2 por limitar não só a ativação e diferenciação dos linfócitos T nos linfonodos, como também por suprimir a resposta pró-inflamatória nos tecidos<sup>125</sup>. A IL10 e o TGF $\beta$  podem induzir as células dendríticas a se diferenciarem em um subtipo especializado chamado de célula dendrítica tolerogênica que tem a capacidade de induzir células Treg. A IL10 também inibe a produção tanto das quimioquinas CC e CXC pelos monócitos ativados; estas moléculas estão implicadas no recrutamento dos monócitos, CD, neutrófilos e células T<sup>118</sup>. Nas células B, a IL10 é um potente co-fator de proliferação destas células, assim como uma molécula associada à sobre-vivência através da indução de Bcl2<sup>121, 126</sup>. As células H-RS podem secretar IL10, contribuindo para um microambiente imunossupressivo, e conseqüentemente, para sua sobrevivência.

Dadas as propriedades biológicas da IL10 em influenciar a composição do microambiente no LHc, mediante o aumento do número das células T imunoreguladoras e o tráfego de células imunes, e dado que muitas células do microambiente do LHc segregam TGF $\beta$ <sup>95</sup>, é possível que fatores genéticos do hospedeiro que definam fenótipos de alta ou baixa expressão desta citocina, como por exemplo os polimorfismos da região promotora da IL10 possam contribuir na definição de algumas características histológicas do LHc pediátrico, assim como influenciar algumas características do ciclo celular nas células H-RS. Até o momento, não existem estudos que avaliem estas hipóteses.

### **2.7.2 Os Polimorfismos da IL10**

Polimorfismo genético é definido como a ocorrência de duas ou mais variantes alélicas determinadas por um locus genético simples, ocorrendo a variante

ou o alelo mais raro com uma frequência populacional igual ou superior a 1% ou 5%, de acordo com o critério escolhido<sup>127</sup>.

Os polimorfismos podem ser do tipo nucleotídeo simples (SNPs), seqüências repetitivas, inserções e deleções<sup>128</sup>. As variantes mais comumente encontrada são SNPs bialélicos<sup>129</sup>, encontrando-se no genoma humano um SNP a cada aproximadamente 300 pares de base (pb)<sup>130</sup>. Foi também observada uma forte correlação entre alelos vizinhos, indicando que, em sua maioria, os SNPs proximamente localizados em um cromossomo são herdados juntos, através de gerações. Os SNPs organizam-se hierarquicamente sob forma de blocos no DNA, chamados haplótipos<sup>131</sup>.

A IL10 humana é codificada por um gene no cromossomo 1, região 1q31–1q32<sup>132</sup> no qual foram identificados mais de cem SNPs, depositados no banco de dados dbSNP (NCBI, National Center for Biotechnology Information). O promotor do gene da IL10 foi extensamente caracterizado<sup>132-133</sup>, tendo sido identificados 14 SNPs com elevado desequilíbrio de ligação entre si, indicando que são herdados em blocos<sup>134</sup>.

Três SNPs são bem caracterizados na porção proximal do promotor do gene da IL-10 os quais se encontram nas posições -1082, -819 e -592<sup>135</sup>. Na posição -1082, ocorre a substituição nucleotídica de uma adenina (A) por uma guanina (G), dentro de um sítio de ligação ao fator de transcrição de Ets<sup>118</sup>. Na posição -819, a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) ocorre em uma região de regulação positiva, e a substituição de uma C por A na posição -592 ocorre em um sítio de ligação a STAT3<sup>118</sup>.

Existe um forte desequilíbrio de ligação entre os alelos -819C e -592C, o que resulta na ocorrência do haplótipo ACC ou GCC, quando existe uma A ou uma

C, respectivamente, na posição -1082. No entanto, a combinação dos alelos -819T e -592A, só ocorre na presença do alelo -1082A resultando na formação do haplótipo ATA. Portanto, somente três dos quatro haplótipos possíveis foram encontrados na população caucasiana<sup>136</sup>. Juntos os haplótipos ACC, ATA e GCC contribuem para mais de 98% dos haplótipos presentes na população norte-americana, com uma pequena representação de um haplótipo raro "GTA"<sup>118, 136</sup>.

A expressão gênica de IL10 resulta em um RNA mensageiro de aproximadamente 2 Kb<sup>137</sup> que é traduzido em uma proteína de 178 aminoácidos. Estudos familiares e de gêmeos indicam que entre 50-75% da variabilidade interindividual nos níveis de IL10 podem ser atribuídas a variações genéticas<sup>138-139</sup>.

Os diferentes genótipos e haplótipos do gene da IL10 foram associados, em estudos *in vitro* e *in vivo*, com uma produção diferencial da proteína<sup>140</sup>. Estudos *in vitro* mostraram que a variabilidade individual pode atingir diferenças de até dez vezes na produção de IL10 entre indivíduos portadores de genótipos de alta e baixa produção<sup>140-141</sup>.

Na maioria dos trabalhos focados no estudo da expressão de IL10, o genótipo -1082GG, assim como o haplótipo proximal GCC, foi relacionado à elevada expressão da proteína, enquanto que o inverso foi encontrado em relação ao genótipo -1082AA e o haplótipo ATA<sup>135, 139, 142-146</sup>. Outros autores encontraram que o genótipo -1082AA e haplótipo ATA são as variantes de alta produção de IL10<sup>147-149</sup>. As controvérsias encontradas na literatura sugerem que as variantes alélicas do promotor da IL10 podem ter efeitos diferentes na regulação da expressão desta molécula de acordo ao tipo celular.

## 2.8 O gene CTLA4 como Possível Candidato à Modulação do Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin Clássico

Em 1970, Bretscher e Cohn propuseram o modelo de dois sinais da ativação linfocitária, para explicar a discriminação “self/nonself”<sup>150</sup>, no qual a ativação T requer dois sinais independentes e complementares; o primeiro é transduzido através do receptor de células T (TCR), após o engajamento antigênico e o segundo, o sinal co-estimulatório, é fornecido pela ligação de um receptor diferente presente na superfície da célula T, seja por fatores solúveis, ou por moléculas presentes na célula apresentadora de antígenos (APC). A clonagem do CD28 em 1987 iniciou o entendimento das bases moleculares da coestimulação.

A ligação de CD28 com os seus ligantes B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86)<sup>151</sup> tem como consequência uma resposta proliferativa das células T e um aumento da expressão de citocinas<sup>152</sup>.

O antígeno 4 do linfócito T citotóxico (do inglês cytotoxic T-lymphocyte antigen, CTLA4), também membro da superfamília de imunoglobulina<sup>153</sup>, é um homólogo de CD28, com capacidade de se ligar a B7-1 e B7-2, porém, com maior afinidade de ligação que CD28<sup>154</sup>.

Tanto CD28, quanto CTLA4 podem ser encontrados na superfície das células T. Em contraste com CD28, que é expresso constitutivamente na membrana da maioria dos linfócitos T CD4+ e em cerca de 50% dos linfócitos T CD8+, CTLA4 é expresso somente nas células T ativadas e é um regulador negativo da função das células T (16)<sup>155</sup>. Diferentemente, a expressão do CTLA4 é constitutiva nas células Tregs<sup>153</sup>.

CTLA4 exerce efeitos distintos e independentes durante as diferentes fases da resposta T, incluindo a definição de um limiar para a ativação T, a

supressão da proliferação das células T e a indução da apoptose em células T ativadas<sup>156</sup>. Os mecanismos responsáveis pela atividade do CTLA4 não são bem entendidos. Sabe-se que CTLA4 reduz o sinal coestimulatório positivo de CD28 através da competição pelos ligantes B7.1 e B7.2 nas células apresentadoras de antígeno, diminuindo a capacidade destas células de ativar células T convencionais<sup>157</sup>. Outros mecanismos pelos quais esta molécula é capaz de regular negativamente a função T incluem a interferência com a sinalização do TCR, bloqueio da produção de IL2, promoção da apoptose das células T<sup>158</sup> e indução da citocina supressora TGF $\beta$ <sup>159</sup>.

CTLA4 é também capaz de inibir a função das células dendríticas pela indução do catabolismo do triptófano, através da hiper-regulação da produção da enzima imunoregulatória indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas APC<sup>160</sup>. Esta enzima atua na quebra do triptofano, o qual é essencial para a proliferação das células T<sup>153, 157</sup>. Mais ainda, CTLA4 pode regular a polarização das células T CD4+ para T-helper (Th) 1 ou Th2, diretamente através do controle da intensidade do sinal de ativação, ou indiretamente, através da produção de IDO.<sup>161</sup>

Camundongos deficientes em CTLA4 manifestam uma doença linfoproliferativa massiva, que é letal por volta de 3 semanas após o nascimento<sup>162</sup>. Estudos com modelos animais sugerem que sua ação inibitória é mais pronunciada na resposta imune secundária do que na primária, levando a crer que a estimulação crônica das células T resultaria em níveis altos e persistentes da proteína CTLA4<sup>163</sup>.

Duas isoformas são descritas para o CTLA4, uma localizada na superfície celular e outra secretada (sCTLA4), resultante do processamento do exon 3 que codifica o domínio transmembrana<sup>153, 164</sup>. A isoforma localizada na superfície celular exerce sua função por ligação direta a B7.1 ou B7.2<sup>153</sup>. Em relação à forma

secretada, pouco se sabe a respeito do funcionamento, e os poucos estudos existentes são controversos quanto ao seu papel nas doenças auto-imunes<sup>153</sup>.

O gene CTLA4 humano está localizado na banda q33 do cromossomo 2 e é composto por 4 éxons que codificam domínios funcionais separados: seqüência líder, domínio extracelular, domínio transmembrana e domínio citoplasmático<sup>165</sup>.

Mais de 100 SNPs tem sido identificados na região do gene CTLA4, e vários estudos têm demonstrado que alguns SNPs funcionais estão relacionados ao risco de desenvolvimento de diversas doenças auto-imunes<sup>153</sup>. Dentre estes, os polimorfismos da posição +49 (seqüência líder) e CT60 (região 3' não traduzida) têm sido muito investigados em relação aos seus efeitos funcionais nas células T, assim como quanto aos efeitos patogênicos nas doenças autoimunes. Os efeitos funcionais descritos para estas variantes genéticas incluem uma maior capacidade de ligação da proteína CTLA4 a B7, níveis maiores de expressão do RNAm, alteração da razão entre isoforma solúvel/transmembrana, regulação da ativação e proliferação T, e controle do número de células Treg na periferia.

O SNP +49 A> G (rs231775) é o único polimorfismo não sinônimo de CTLA4, que causa a substituição do aminoácido 17Ala por 17Thr na sequencia líder da proteína. A ligação a B7 é maior em CTLA4-17Thr (genótipo +49AA) que em 17Ala (+49GG), indicando que a substituição aminoacídica de 17Ala por 17Thr aumenta significativamente a eficiência de interação entre CTLA4 e B7.1<sup>166</sup>. Como consequência o efeito inibitório na ativação e proliferação de células T é maior em CTLA4-17Thr (AA) que em CTLA4-17Ala (GG). O genótipo +49AA também foi associado a menor ativação das células Treg, menor produção de IL2, e menor proliferação T, quando comparado ao efeito do genótipo +49GG<sup>167-168</sup>. Além disso, a variante +49 G>A está relacionado ao nível de expressão da proteína CTLA4. Tem

sido demonstrado que o alelo +49G tem expressão do RNAm diminuída em células não estimuladas e de isoforma celular (transmembrana) em células estimuladas, em relação ao alelo +49A<sup>168-169</sup>.

O SNP CT60 A>G (rs3087243) tem sido implicado no processamento e produção da forma solúvel do CTLA4. Os portadores do alelo CT60G mostram menor nível de sCTLA4. Ueda et al<sup>170</sup> encontraram o alelo G de CT60 associado a uma redução de 50% no nível de isoforma solúvel (sCTLA-4). O alelo CT60G foi associado a um risco maior de desenvolver doença autoimune, devido aos níveis baixos de sCTLA4, e a conseqüente menor capacidade de suprimir a resposta T. Por sua vez, genótipos de alta produção de sCTLA-4 (CT60AA) mostraram proteger contra doença autoimune.<sup>170</sup>

Pouco se sabe a respeito da funcionalidade do SNP na região promotora do gene CTLA-4, SNP -1722 (A>G) (rs733618), sendo controversos os resultados a respeito da maior ou menor produção da proteína. Os indivíduos portadores do genótipo -1722AA têm sido associados ao maior risco de desenvolvimento lúpus eritematoso sistêmico<sup>171</sup> e portanto, a presença do alelo -1722A deve estar associada a menor efeito inibitório.

Visto que os SNPs descritos são capazes de influenciar a proliferação de linfócitos T, é plausível que estes SNPs possam influenciar a composição do microambiente tumoral no LHC. Até o momento, não existem estudos na literatura voltados a elucidar esta hipótese.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Realizar um estudo das características clínicas, morfológicas, de imunexpressão das células neoplásicas e reacionais, e de fatores genéticos do hospedeiro para contribuir na construção de um modelo histo-patogenético do linfoma de Hodgkin clássico na faixa etária pediátrica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1) Estudar características demográficas, de associação com o EBV e de apresentação clínica do LHc pediátrico em uma localidade da região Sudeste do Brasil (Rio de Janeiro), comparando-as com o descrito para outras regiões geográficas;

2) Caracterizar por imunohistoquímica as diferentes subpopulação de linfócitos do microambiente tumoral no LHc pediátrico e sua distribuição nos diferentes subtipos histológicos e subgrupos clínicos;

3) Determinar o impacto prognóstico do número e tipo de células inflamatórias no microambiente do LHc pediátrico;

4) Determinar se a presença do vírus Epstein-Barr influencia a composição do microambiente tumoral;

6) Determinar as possíveis relações entre a composição do microambiente tumoral e algumas características de funcionamento do ciclo celular e apoptose nas células neoplásicas;

7) Determinar se os polimorfismos da região promotora da IL10 e do gene CTLA4 poderiam influenciar as características histológicas do LHC pediátrico e a composição do microambiente tumoral.

## **4- METODOLOGIA**

### **4.1 Desenho do Estudo**

Estudo retrospectivo do tipo coorte.

### **4.2 População do Estudo**

Pacientes matriculados no Instituto Nacional de Câncer (INCA) no período de 01/01/1999 a 31/12/2006, tratados nos serviços de Hematologia e Oncologia Clínica, cujo diagnóstico no Departamento Integrado de Patologia (DIPAT) tenha sido de linfoma de Hodgkin clássico.

### **4.3 Critérios de Inclusão**

As condições de elegibilidade dos pacientes para este estudo foram:

- a) Idade de até 18 anos ao diagnóstico;
- b) Diagnóstico de linfoma de Hodgkin clássico, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>1</sup>;
- c) Existência do bloco de parafina com material tumoral do diagnóstico no arquivo do Departamento Integrado de Anatomia Patológica do INCA;
- d) Ter sido tratado com protocolos de tratamento baseados na administração de antraciclinas.

### **4.4 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos do estudo os casos que tiveram bloco de parafina com material tumoral do diagnóstico insuficiente para realização das técnicas experimentais propostas neste estudo: imunohistoquímica, hibridização *in situ* e

PCR. Os pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular<sup>1</sup> foram também excluídos do estudo, assim como os pacientes portadores do HIV.

#### 4.5 Dados Clínico-Epidemiológicos

Os dados de cada paciente referentes a procedência, história clínica, exames clínico-radiológico-laboratoriais ao diagnóstico, tratamento, resposta terapêutica e seguimento, conforme ficha de registro, (anexo II) foram obtidos do prontuário médico.

Na tabela 4.1, encontram-se os valores de normalidade para os exames laboratoriais avaliados: leucometria, hemoglobina, desidrogenase láctica (DHL) e velocidade de hemossedimentação (VHS).

Tabela 4.1: Valor de referência dos exames laboratoriais analisados.

EXAME	VALOR DE REFERÊNCIA
Leucometria	6 a 10 x 10 <sup>9</sup> /l
Hemoglobina	13 g/dl
Desidrogenase Láctica	até 480 U/l
Velocidade de Hemossedimentação	até 20mm

O estadiamento dos pacientes foi realizado segundo o preconizado pelo Estadiamento Ann Arbor<sup>23</sup>. Os pacientes com estadiamento IIB, IIIB e IV foram considerados como de grupo desfavorável, os demais como de grupo favorável<sup>24</sup>.

#### 4.6 Estudo Histológico

a) Para todos os blocos de parafina contendo material tumoral ao diagnóstico, foram preparadas lâminas comuns coradas por hematoxilina e eosina

(HE) segundo técnica padrão<sup>172</sup>, para que fossem escolhidos os blocos com melhor representatividade da neoplasia. Desta forma, cada paciente teve apenas um bloco de parafina utilizado em todas as etapas experimentais do estudo.

b) Todos os casos foram revistos independentemente pelo discente e pelo Prof. Gerald Niedobitek (Unfallkrankenhaus Berlim, Berlim - Alemanha). Os casos discordantes foram vistos ao mesmo tempo num microscópio “double-head” e foram discutidos até um consenso ser obtido. Os subtipos histológicos (EN, CM, DL e RL) foram classificados segundo a OMS<sup>1</sup>.

c) Foi determinado o número de células neoplásicas em 10 campos de grande aumento (CGA), o número de eosinófilos (Eo) em 10 CGA e o número de mitoses em 10 CGA. Para tanto, foi utilizado um microscópio Nikon modelo Elicpse E-2000 composto por: um par de lentes oculares com aumento de 10x e 20mm de campo (campo amplo); lentes objetivas planométricas de ótica infinita com aumento de 4x, 10x, 40x e 100x. O campo de grande aumento foi considerado como o aumento total resultante da combinação das lentes oculares (10x) com a lente objetiva de 40x.

d) Os casos de esclerose nodular foram graduados seguindo os critérios propostos pelo Grupo Nacional Britânico de Investigação de Linfoma<sup>32</sup>. Desta forma, a EN foi considerada de grau I quando 75% ou mais dos nódulos continham escassas células H-RS num fundo rico em linfócitos ou inflamatório misto ou fibrohistiocítico. A EN grau II foi estabelecida quando pelo menos 25% dos nódulos continham um número aumentado de células H-RS, representado por ninhos de células neoplásicas preenchendo um CGA<sup>1</sup>.

e) O risco da esclerose nodular foi avaliado segundo os critérios propostos por von Wasielewski et al<sup>36</sup>, em alto e baixo risco. A determinação do risco se baseia em:

- Eosinofilia: caracterizada pela presença de eosinófilos num percentual de no mínimo 5% de todas as células do linfonodo, ou grupos de eosinófilos em no mínimo 5 CGA;
- Atipia das Células H-RS: mais de 25% das células neoplásicas devem ser bizarras e de aparência anaplásica com núcleo pleomórfico, hipercondensado e membrana nuclear irregular;
- Depleção Linfocitária: os linfócitos devem representar menos de 33% de todas as células do linfonodo

Os casos de EN que não apresentarem nenhum destes fatores são classificados como EN de baixo risco (EN-BR) e os casos com pelo menos um dos fatores são classificados como EN de alto risco (EN-AR).

f) O grau de envolvimento interfolicular pelo linfoma de Hodgkin foi estimado semiquantitativamente, conforme o escore proposto por Zhou et al<sup>7</sup>:

0. ausência de folículo residual;
1. folículo remanescente e/ou ocasionais folículos com centros germinativos;
2. freqüentes folículos residuais com centros germinativos e infiltrado tumoral interfolicular;
3. hiperplasia folicular extensiva com infiltrado tumoral interfolicular.

Os casos com escore 2 ou 3 foram classificados como LHc com padrão interfolicular.

#### **4.7 Construção do “Tissue Micro-Array” (TMA)**

As lâminas de HE representativas da neoplasia, conforme descrito no item “a” da seção “4.6”, foram utilizadas para a identificação das áreas usadas nos TMAs. Foram realizadas marcações circulares das regiões mais representativas do tumor nas lâminas de HE e nos blocos de parafina correspondentes (blocos doadores). Usando um “tissue microarrayer” (Beecher Instrument, Silver Spring, MD), as áreas de interesse previamente marcadas foram retiradas e transferidas para um bloco receptor de resina sintética (Histosec, Merck). Para cada caso, foram retirados dois cilindros de 1 mm (“cores”) de duas áreas distintas do tumor.

O bloco receptor foi cortado numa espessura de 4µm numa quantidade suficiente para a produção de 100 lâminas. Os cortes foram recolhidos com filme aderente comercial (Instrumedics) e depositados em lâminas de vidro revestidas com adesivo especial (Starfrost, Instrumedics). O tecido foi fixado através da exposição das lâminas à luz ultravioleta por 15 minutos e o adesivo plástico foi removido com solvente não clorinado (TPC, Instrumedics). As lâminas foram identificadas e armazenadas a -20° C.

A etapa do estudo referente à construção do TMA foi realizada em colaboração com o Dr. Fernando Augusto Soares, Departamento de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo.

#### **4.8 Estudo Imunohistoquímico**

Os anticorpos primários utilizados na caracterização da população celular neoplásica, bem como o padrão de marcação esperado e os pontos de corte estão descritos na Tabela 4.2. Os anticorpos primários utilizados na determinação das populações celulares benignas do microambiente tumoral e o padrão de marcação esperado estão descritos na Tabela 4.3.

#### **4.8.1 Procedimentos Gerais**

Foi utilizada a técnica do complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP), seguindo os passos:

a) Desparafinização dos cortes por incubação em estufa a 60°C por 30 minutos, seguida por 2 banhos em xilol de 10 minutos;

b) Hidratação dos cortes através de banhos sucessivos (5 minutos) em etanol de concentração descendente (etanol 100%, etanol 70%), seguidos de lavagem das lâminas em água corrente por 5 minutos;

c) Recuperação antigênica por calor em forno de microondas à potência máxima ou em panela de pressão. Após a recuperação, as lâminas imersas na solução foram deixadas à temperatura ambiente por 20 minutos e posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos;

d) Bloqueio da peroxidase endógena através de 3 banhos de 5 minutos, cada um, em peróxido de hidrogênio 10 volumes. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos;

e) Bloqueio de proteínas inespecíficas, com solução de leite em pó desnatado solúvel a 3% por 20 minutos;

f) Reação do anticorpo primário: O anticorpo primário (100 µl, diluição em BSA 3%) foi aplicado sobre cada corte, seguido de incubação em câmara úmida por

1 hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram submetidas a três banhos de 5 minutos em tampão PBS;

g) Incubação do anticorpo de ligação (visualização): O anticorpo secundário foi aplicado sobre cada corte por 30 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com três banhos de 5 minutos em PBS. O kit utilizado variou de acordo com o anticorpo primário estudado (Tabelas 4.2 e 4.3);

h) Incubação do ligante ao anticorpo secundário (visualização): 100 µl da solução foram aplicados sobre cada corte por 20 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com três banhos de 5 minutos em PBS. Os reagentes empregados variaram de acordo com o anticorpo primário utilizado (Tabelas 4.2 e 4.3);

i) Revelação: 100 µl da solução substrato-cromógeno (Cromógeno DAB DakoCytomation) foram aplicados em cada corte por até 5 minutos. As lâminas foram colocadas em água corrente quando os cortes adquiriram a coloração acastanhada ou após o término dos 5 minutos de incubação. Após o término da revelação, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

j) Contra-coloração: as lâminas foram colocadas em solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos, sendo posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos;

k) Desidratação das lâminas através de banhos sucessivos de etanol a concentrações descendentes (etanol 70%, etanol 100%, etanol 100%, por 5 minutos cada banho). A desidratação foi seguida de um banho em xilol por 5 minutos;

l) As lâminas foram montadas e cobertas com lamínula utilizando meio de montagem não-aquoso.

#### **4.8.2 Método de Dupla Marcação**

Esta técnica foi utilizada para determinar o número de células FoxP3+ coexpressando Granzima B. O anticorpo anti-Granzima B foi usado como primeiro anticorpo primário, utilizando o protocolo descrito no item 4.9.1, porém utilizando o kit ZytoChem Plus HRP Polymer (Zytomed Systems, Berlim, Alemanha) na etapa de visualização .

Após a etapa de utilização do DAB, a lâmina de TMA foi lavada por 5 minutos (3x) em PBS e o segundo anticorpo primário (anti-FoxP3) foi incubado, seguindo os passos descritos no item 4.9.1.

Na etapa de revelação, foi utilizado o kit ZytoChem Plus AP Polymer (Zytomed Systems, Berlim, Alemanha), empregando a fucsina como cromógeno (Zytomed Systems, Berlim, Alemanha).

A incubação da lâmina de TMA com a solução de fucsina foi controlada no microscópio óptico convencional, sendo a reação interrompida após a obtenção da coloração ótima desejada, colocando-a em PBS. A partir de então foram seguidos os passos posteriores ao item 4.8.1 – i.

Todas as imunomarcações foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCa, com exceção da dupla marcação, c-Maf e T-bet que foram realizadas no Departamento de Patologia do Hospital Unfallkrankenhaus Berlim (Berlim – Alemanha), durante a etapa do “doutorado-sanduíche”.

#### **4.8.3 Avaliação e Pontos de Corte**

Para os anticorpos p53, p21 e Ki67 foi adotado o sistema semiquantitativo de avaliação da positividade baseado em escores<sup>173</sup>: 1+: até 10% de células neoplásicas positivas; 2+: 11 à 25% de células neoplásicas positivas; 3+: 26 à 50%

de células neoplásicas positivas; 4+: 51 à 75% de células neoplásicas positivas; 5+: mais de 75% de células neoplásicas positivas.

A expressão combinada de p53 e p21 foi utilizada para classificar os casos de acordo com a funcionalidade de p53, seguindo critérios padronizados na literatura<sup>83, 174</sup>. De acordo com a expressão combinada, 4 categorias são possíveis: I) p53-/p21-, II) p53+p21+, III) p53-/p21+, IV) p53+/p21-. Os casos exibindo o padrão II e III foram considerados como tendo a via de p53 funcional.

#### **4.8.4 Análise Microscópica Computacional Assistida no Estudo do Microambiente Tumoral e das Células Neoplásicas**

Todas as lâminas de TMA imunomarcadas foram vistas pelo discente e o Prof. Gerald Niedobitek para assegurar a confiabilidade das marcações. Os casos discordantes foram vistos ao mesmo tempo num microscópio “double-head” e foram discutidos até um consenso ser obtido.

Para a caracterização do microambiente tumoral, as lâminas de TMA foram submetidas à reação de imunohistoquímica com os anticorpos descritos na tabela 4.3. Cada core foi fotografado num aumento de 200 vezes, utilizando uma câmera AxioCam MRc (Zeiss, Germany). As imagens foram transferidas para um computador pessoal. Com o programa HISTO (Biomax, Elangen, Alemanha), foi determinado o número de linfócitos imunomarcado por 1mm<sup>2</sup>.

Para a determinação do número de células neoplásicas uninucleadas (NUM) e multinucleadas (NMN), foram utilizadas as lâminas convencionais coradas por HE e escolhido o campo com maior representatividade dessas células. Este campo foi fotografado num aumento de 200 vezes, utilizando uma câmera AxioCam MRc (Zeiss, Germany). As imagens foram transferidas para um computador pessoal.

Com o programa HISTO (Biomax, Elangen, Alemanha), foi determinado o número de células NUN e NMN por  $1\text{mm}^2$ . Para cada caso, a razão entre o número de células NUN e NMN foi obtida.

Os percentis 25 e 50 para cada população linfocitária foram utilizados a fim de categorizar a intensidade do infiltrado.

Na análise, foi considerado para cada caso o core com maior número de células H-RS misturadas aos linfócitos. Centros germinativos, quando presentes, não foram considerados na análise. Para cada população linfocitária, os casos que não tiveram imunomarcagem em ambos os cores foram considerados como não avaliáveis.

Tabela 4.2: Descrição dos anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico da caracterização das células neoplásicas, em relação as questões técnicas do produto, tipo de marcação e critérios de positividade.

<b>ANTICORPO</b>	<b>CLONE</b>	<b>FABRICANTE</b>	<b>DILUIÇÃO</b>	<b>TAMPÃO</b>	<b>IMUNODETECÇÃO</b>	<b>MARCAÇÃO</b>	<b>POSITIVIDADE</b>
CD20	L-26	DakoCytomation	1:1000	Citrato	LSAB	Membrana	Qualquer célula H-RS
CD15	C3D-1	DakoCytomation	1:50	Citrato	LSAB	Membrana e/ou para- nuclear	Qualquer célula H-RS
CD30	Ki-1	DakoCytomation	1:40	EDTA	Envision	Membrana e/ou para- nuclear	Qualquer célula H-RS
LMP-1	CS 1-4	DakoCytomation	1:50	Citrato	LSAB	Membrana	Qualquer célula H-RS
p53	DO-7	DakoCytomation	1:500	EDTA	LSAB	Nuclear	>50% de células H-RS
p21	SX-118	DakoCytomation	1:50	EDTA	LSAB	Nuclear	>50% de células H-RS
Ki-67	MIB-1	DakoCytomation	1:100	Citrato	LSAB	Nuclear	>50% de células H-RS
Bcl2	124	DakoCytomation	1:50	EDTA	Envision	Membrana	>10% de células H-RS

Tabela 4.3: Anticorpos utilizados na caracterização imunohistoquímica das células inflamatórias do microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin. Descrição das questões técnicas referentes ao produto e o tipo de marcação esperada.

<b>ANTICORPO</b>	<b>CLONE</b>	<b>FABRICANTE</b>	<b>DILUIÇÃO</b>	<b>TAMPÃO</b>	<b>IMUNODETECÇÃO</b>	<b>MARCAÇÃO</b>
CD3	Policlonal	DakoCytomation	1:50	EDTA	LSAB	Membrana
CD4	1F6	Novocastra	1:50	EDTA	Envision	Membrana
FoxP3	22510	Abcam	1:150	EDTA	Envision	Nuclear
C-maf	M-153	Santa Cruz	1:50	EDTA	ZytoChem Plus HRP Polymer	Nuclear
T-bet	4B10	Santa Cruz	1:50	EDTA	ZytoChem Plus HRP Polymer	Nuclear
CD8	C8/144B	DakoCytomation	1:50	EDTA	Envision	Membrana
Tia-1	TIA-1	Abcam	1:150	Citrato	LSAB	Membrana
Granzima B	GrB-7	DakoCytomation	1:90	Citrato	Envision	Membrana

#### **4.9 Hibridização *in situ* para EBER-1 (EBER-ISH)**

A infecção pelo EBV foi investigada nas amostras de tumor fixados e incluídos em parafina (FIP), pela técnica de hibridização *in situ*, utilizando sondas biotiniladas para o RNA EBER-1 conforme os passos descritos a seguir<sup>175</sup>:

a) Desparafinização dos cortes por incubação em xilol na estufa à 60°C por 30 minutos, seguida por 2 banhos em xilol de 10 minutos, cada um;

b) Hidratação dos cortes através de banhos sucessivos em etanol de concentração descendente e água destilada (etanol 100%, etanol 95%, etanol 70%, água destilada), durando cada banho 5 minutos;

c) Incubação dos cortes com proteinase K (20µg/ml) em câmara úmida e à 65° C por 30 minutos, seguido por dois banhos de 3 minutos em água destilada;

d) Desidratação dos cortes através de banhos sucessivos em etanol de concentração ascendente (etanol 70%, etanol 95%, etanol 100%), durando cada banho 5 minutos, seguido de secagem dos cortes em temperatura ambiente;

e) Hibridização: os cortes foram incubados com 10µl da sonda biotinilada EBER-1 (Novocastra) e cobertos com lamínulas. Em seguida, as lâminas foram acondicionadas na câmara úmida e levadas por 15 minutos à estufa a 65° C para o bloqueio da fosfatase alcalina endógena. Após este tempo, as lâminas foram incubadas em estufa à 37° C por 2 horas;

f) Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em TBS 0,1% Triton X-100, três banhos de 3 minutos cada um, e acondicionadas em câmara úmida. O bloqueio de hibridização inespecífica foi realizado por incubação com 100µl de solução bloqueante (TBS 0,1%; Triton X-100; BSA 3%) por 10 minutos à temperatura ambiente;

g) O anticorpo anti-FITC conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:200 em solução bloqueante) (Novocastra), foi adicionado (100 µl) e incubado por 20 minutos. As lâminas foram lavadas duas vezes em TBS, por 3 minutos, seguido de incubação em solução de fosfatase alcalina (pH 9,0) por 5 minutos;

h) Detecção: Aplicou-se 100 µl de solução de detecção preparada no momento (1ml de solução de fosfatase alcalina, 8 µl do BCIP/NBT, 1 µl de Levamisole) (Novocastra). Posteriormente, os cortes foram cobertos por lamínulas e a incubação procedeu por 16 horas à temperatura ambiente, em câmara úmida e escura;

m) Após a incubação com a solução de detecção, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos, sendo posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos;

n) As lâminas foram montadas em meio aquoso.

Utilizou-se para cada reação, como controle positivo, uma lâmina contendo corte de linfoma de Burkitt EBV-positivo. A reação foi considerada positiva quando se observou a marcação nuclear enegrecida. Os casos de LHc foram considerados positivos para o EBV quando qualquer uma das células H-RS exibissem a marcação nuclear.

#### **4.10 Extração de DNA**

Amostras de tumor FIP foram processadas para obtenção de DNA por métodos padronizados no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO<sup>176</sup>, a partir de seções microtomizadas de 5 µm.

A desparafinização dos cortes foi realizada com 1 ml de xilol, homogenização por 5 minutos e centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Estes procedimentos foram repetidos 2 - 3 vezes, de acordo à quantidade de parafina no tecido. Depois de eliminado o sobrenadante, o tecido foi secado à temperatura ambiente.

Os tecidos desparafinizados foram ressuspensos em tampão não iônico de lise nuclear (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA 0,1 mM; Tween 20® 0,5% v/v e H<sub>2</sub>O destilada), e proteinase K (200 µg/ml), seguido de incubação por 12h a 65°C. Finalizada a digestão, centrifugou-se o material à máxima velocidade por 5 minutos. Uma vez recuperado o sobrenadante foi adicionado um volume apropriado de solução de precipitação de proteínas (Acetato de amônio 7.5 M, Promega), seguido de homogenização e incubação por 5 minutos em banho de gelo. Depois de centrifugação à máxima velocidade, o sobrenadante foi transferido a um novo tubo e o DNA foi precipitado com isopropanol (Merck) gelado. O "pellet" foi lavado 3 vezes com etanol 95% (Merck) e o DNA obtido foi ressuspendido em água destilada estéril, a uma concentração aproximada de 200 ng/µl.

A quantificação do DNA foi realizada em um espectrofotômetro Nanodrop™ 9000 (Thermo Scientific), por meio de leituras feitas no comprimento de onda de  $\lambda$  260nm, considerando que uma unidade de densidade óptica corresponde a aproximadamente 50µg/ml para DNA de dupla fita<sup>177</sup>. A pureza das amostras foi estimada pela relação 260/280. Amostras com valores entre 1,8 e 2,0 foram consideradas com grau de pureza satisfatório.

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Antes de realizar as reações de PCR convencional, a amplificabilidade do DNA extraído foi avaliada utilizando uma reação de PCR multiplex incluindo

iniciadores universais para os genes constitutivos de cópia simples GAPDH e  $\beta$ -globina, abrangendo uma faixa de amplificação entre 110 e 454 pb<sup>176</sup>.

#### **4.11 Caracterização dos Polimorfismos do Promotor do Gene IL10**

##### **4.11.1 Estratégia de Genotipagem**

Foram estudados 3 polimorfismos de base simples ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) da região proximal do promotor do gene da IL10: os SNPs -1082 A/G, -819 C/T e -592 C/A<sup>135</sup>. Estes SNPs estão em desequilíbrio de ligação e apresentam combinações mais freqüentes na população, constituindo haplótipos proximais<sup>141</sup>.

Os experimentos para detecção dos polimorfismos da IL10 foram realizados por etapas. A princípio, foi genotipada a posição -1082G/A, com duas reações de PCR realizadas em paralelo. Posteriormente, realizaram-se os experimentos para a genotipagem da posição -592A/C. A confirmação do genótipo do SNP -819 foi realizada mediante a incorporação de um iniciador específico nas reações de haplotipagem experimental. A combinação dos genótipos dos dois SNPs foi confirmada por reações AS-PCR (do inglês, Allele Specific Polymerase Chain Reaction) cruzadas utilizando iniciadores específicos para as posições -1082, -819 e -592. Esta técnica foi realizada “às cegas” em relação aos resultados das PCRs simples para genotipagem dos SNPs -1082 e -592.

##### **4.11.2 Genotipagem dos SNPs -1082 A/G e -592A/C**

Para a genotipagem por AS-PCR foram realizadas duas reações em paralelo. Um dos iniciadores é comum para ambas as reações e o outro é

desenhado em duas versões que diferem no nucleotídeo situado no extremo 3', possibilitando a discriminação entre as variantes alélicas A ou G<sup>178-179</sup>.

Foram realizadas duas reações independentes, com as seguintes combinações de iniciadores: JW-F/B1 para amplificar o alelo G e JW-F/B2 para amplificar o alelo A da posição -1082. Para a identificação dos alelos -592A e -592C, as combinações de iniciadores usadas foram 592/592A e 592/592C, respectivamente. As seqüências dos iniciadores para ambas as reações encontram-se descritas no anexo VI.

As reações finais para genotipagem de ambos os SNPs foram realizadas em volumes finais de 30 µl, com 30 ciclos e temperatura de "annealing" de 60°C para o SNP-592 e 59°C para o SNP-1082. As reações de PCR continham tampão de reação 10 mM KCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,2 mM de cada dNTP, 0,33 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen). Foram usados 50 ng de DNA genômico como substrato para as reações de PCR.

Os produtos das reações de AS-PCR foram visualizados em géis de poli-acrilamida 8% corados com nitrato de prata. O tamanho esperado dos produtos de amplificação variou entre 134 pb e 150 pb para a posição -1082, devido à existência de uma região de microsatélite flanqueada pelos iniciadores utilizados na reação, e foi de 200 pb para a posição -592.

#### **4.11.3 Controle de Genotipagem do Promotor do Gene da IL10**

Com o propósito de diminuir a incidência de erros de genotipagem, foram abordadas diversas estratégias para a confirmação dos resultados:

a) Todas as reações foram repetidas pelo menos duas vezes em cada caso. Os homozigotos foram objeto de especial atenção, no intuito de eliminar o viés por sub-deteção de alelos.

b) Para cada experimento, amostras de genótipo conhecido foram usadas como controles, incluindo, 2 homozigotos do alelo de maior frequência, 2 do alelo variante, 2 heterozigotos e 2 controles sem DNA.

c) A hipótese do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi periodicamente testada através das análises das frequências genóticas pelo teste do  $\chi^2$ . Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser considerados evidência de erros de genotipagem<sup>180</sup>.

#### **4.12 Caracterização dos Polimorfismos do Gene CTLA4**

Para o estudo dos polimorfismos de CTLA4 foram escolhidas as seguintes posições: rs733618 (-1722 A/G), rs5742909 (+49 A/G) e rs3087243 (CT60 A/G), baseado em funcionalidade e frequência populacional >5%.

Foram utilizados 20ng de DNA de alto peso molecular ou 50ng de DNA FIP (nesse último caso, para a otimização de amplificabilidade devido à possível degradação do material nesse tipo de processamento) para volumes finais de 6,7 ul.

Em cada amostra foi acrescido 0,8ul do ensaio SNPs Genotyping Applied Biosystems® contendo o par de primers (um para cada alelo) e as sondas fluorescentes, VIC para o alelo selvagem e FAM para o alelo mutante de cada posição, e 7,5ul do Tampão TaqMan Universal PCR Master Mix®.

As reações foram aliquotadas em placas de 96 poços (MicroAmp Applied Biosystems ®) seladas com o adesivo ótico (MicroAmp Applied Biosystems ®) ou tampas óticas (MicroAmp Applied Biosystems ®) e amplificação foi realizada em um

aparelho ABI 7000. Em todos os ensaios foram utilizados 3 controles negativos, contendo apenas os primers e o mix de reação; e ainda 3 controles de cada genótipo, previamente determinados.

Para a posição +49A/G, o perfil térmico consistiu de uma etapa de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 92°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para as posições -1722 A/G e CT60 G/A foi utilizado um perfil térmico que consistiu de 95°C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos à 92°C por 15 segundos e 60°C por 90 segundos. A amplificação foi seguida de uma etapa de 1 minuto à 60°C para realização da leitura e interpretação dos resultados (“post-read”). Após isso, a análise dos genótipos foi feita com a ferramenta de discriminação alélica do programa ABI PRISM 7000 SDS.

#### **4.13 Eletroforese e Avaliação dos Produtos de PCR**

##### **4.13.1 Preparação de Géis de Agarose**

Os géis de agarose foram confeccionados com tampão TAE e quantidades variáveis de agarose (0,8-2,5%) de acordo com o tamanho dos fragmentos a serem analisados<sup>177</sup>. Para permitir a visualização sob luz UV foi adicionado 0,5 µg/ml brometo de etídeo (Sigma). Como marcadores de peso molecular foram usados “100 bp ladder” e “50 bp ladder”, (Invitrogen).

##### **4.13.2 Preparação e Coloração de Géis de Poliacrilamida**

Géis não desnaturantes com concentração de 8% de acrilamida foram preparados a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida 30% (anexo VII) e tampão TAE. Como catalisadores da polimerização foram adicionados persulfato de

amônio (Biosolve) e TEMED (Sigma) a uma concentração de 0,001% (v/v) e 0,067% v/v, respectivamente.

Os produtos separados nos géis de poliacrilamida foram revelados mediante a coloração com nitrato de prata. Os géis foram fixados por 10 minutos em solução aquosa contendo 10% v/v metanol (Merk) e 0,5% v/v ácido acético glacial (Merk). Foram então incubados por 10 minutos em solução aquosa 3% v/v metanol, 0,15% v/v ácido acético glacial e 0,7% p/v de  $\text{NO}_3\text{Ag}$  (Vetec). Os produtos foram finalmente revelados até o aparecimento nítido das bandas com solução aquosa de 30% v/v NaOH (Vetec) e 0,3% v/v formaldeído (Merk).

#### **4.14 Definições de Resposta e Sobrevida**

As definições de resposta e sobrevida são apresentadas abaixo:

- a) Resposta Completa: ausência de tumor ao final do tratamento (resolução de todas as lesões conhecidas com duração da resposta de pelo menos 4 semanas).
- b) Resposta Parcial: redução de 50 a 99% de todas as lesões tumorais ao final do tratamento.
- c) Resposta Menor: redução de 25 a 49% de todas as lesões tumorais ao final do tratamento.
- d) Doença Estável: redução de menos de 25% das lesões tumorais sem o surgimento de novas lesões ao final do tratamento.
- e) Progressão de Doença: surgimento de novas lesões ou aumento em 25% de alguma das lesões iniciais ao final do tratamento.
- f) Remissão Clínica Completa: ausência de sinais e/ou sintomas atribuíveis ao LH e comprovados por exame clínico, de imagem e laboratorial.

g) Remissão Medular: ausência de células neoplásicas em medula óssea ao final do tratamento.

h) Sobrevida Livre de Eventos (SLE): período, em meses, compreendido entre o diagnóstico e a recaída, óbito por causas não tumorais (mas sem evidências de doença) ou último seguimento (do estudo).

i) Sobrevida Global (SG): período compreendido, em meses, entre o diagnóstico e o óbito ou último seguimento (do estudo).

O tipo de resposta obtido por cada paciente foi determinado a partir das informações registradas nos prontuários médicos pelos médicos responsáveis pelo tratamento dos pacientes. Estes médicos utilizaram exames de imagem, físico e de laboratório.

Para a análise da SLE, conforme definição prévia, era necessário que houvesse no prontuário o registro da informação pelo médico-assistente da ausência ou presença do tumor ao fim do tratamento (informação esta obtida após os exames de imagem, clínico e de laboratório ao término do tratamento), bem como a documentação do estatus de seguimento (recaída, óbito por causas não tumorais ou remissão clínica completa).

Já para o estudo da SG, era necessário que houvesse nos prontuários os registros referentes ao estatus de seguimento dos pacientes: se vivo até o último seguimento do estudo ou morto (bem como a data do óbito).

Todos os pacientes utilizaram protocolos de tratamento baseados na administração de antraciclina (Anexo III). Para as análises de sobrevida, foram então considerados como se tivessem submetidos ao mesmo protocolo de tratamento, uma vez que, não houve diferença na SLE e na SG entre os regimes terapêuticos empregados neste estudo.

Todos os protocolos utilizados neste estudo são equivalentes quanto às chances de resposta completa e são baseados nos mesmos princípios terapêuticos<sup>156-162</sup>.

#### **4.15 Análise Estatística**

As frequências gênicas e genótípicas foram calculadas pelo método de contagem direta. Para cada posição polimórfica, as frequências genótípicas observadas foram comparadas com as esperadas segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, mediante testes de  $\chi^2$ .

A existência de associações entre variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste de  $\chi^2$  ou o teste exato de Fisher, de acordo com o tamanho das amostras. A magnitude dessas associações foi estimada como odds ratios (OR) ou riscos relativos (RR), utilizando intervalos de confiança de 95%.

As comparações de distribuição entre variáveis contínuas foram realizadas através de métodos não paramétricos (Testes de Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis e Spearman).

A análise de agrupamentos hierárquicos foi utilizada para explorar as estruturas de associação entre as variáveis clínico-epidemiológico-histológicas e os marcadores de agressividade do LHc.

A estimação da sobrevida foi realizada com o método de Kaplan-Meier. A comparação univariada de curvas de sobrevida foi realizada com o teste log-rank. O modelo multivariado de Cox foi utilizado para calcular os “hazard ratios” e o intervalo de confiança de 95%.

Todos os testes foram de duas caudas e um valor de  $p$  menor que 0,05 foi indicativo de significação estatística. Para estas análises foi utilizado o programa SPSS versão 13.0 (SPSS Inc, EUA).

#### **4.16 Critérios Éticos**

Este estudo obedece às diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde, em sua resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, visando assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado.

Foram adotadas medidas que asseguraram a confidencialidade e a privacidade dos pacientes, bem como o sigilo e a segurança dos dados obtidos.

O referido projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (Protocolo 37/05) (Anexo I).

## 5- RESULTADOS

Foram alocados para este estudo 100 casos pediátricos de LHc.

### 5.1 Características Gerais dos Casos Analisados

#### 5.1.1 Características Epidemiológicas e Clínico-laboratoriais

A idade ao diagnóstico variou de 3 à 18 anos (mediana de 14 anos), com predomínio das crianças de maior idade e adolescentes. A divisão por grupos etários ( $\leq 10$  anos vs.  $> 10$  anos) mostrou 27 crianças (27%) no grupo de menor idade e 73 (73%) no grupo de maior idade (Figura 5.1).

Quanto ao gênero, 64 (64%) pacientes foram do sexo masculino e 36 (36%) do sexo feminino, resultando numa relação masculino:feminino (M:F) de 1,7:1.

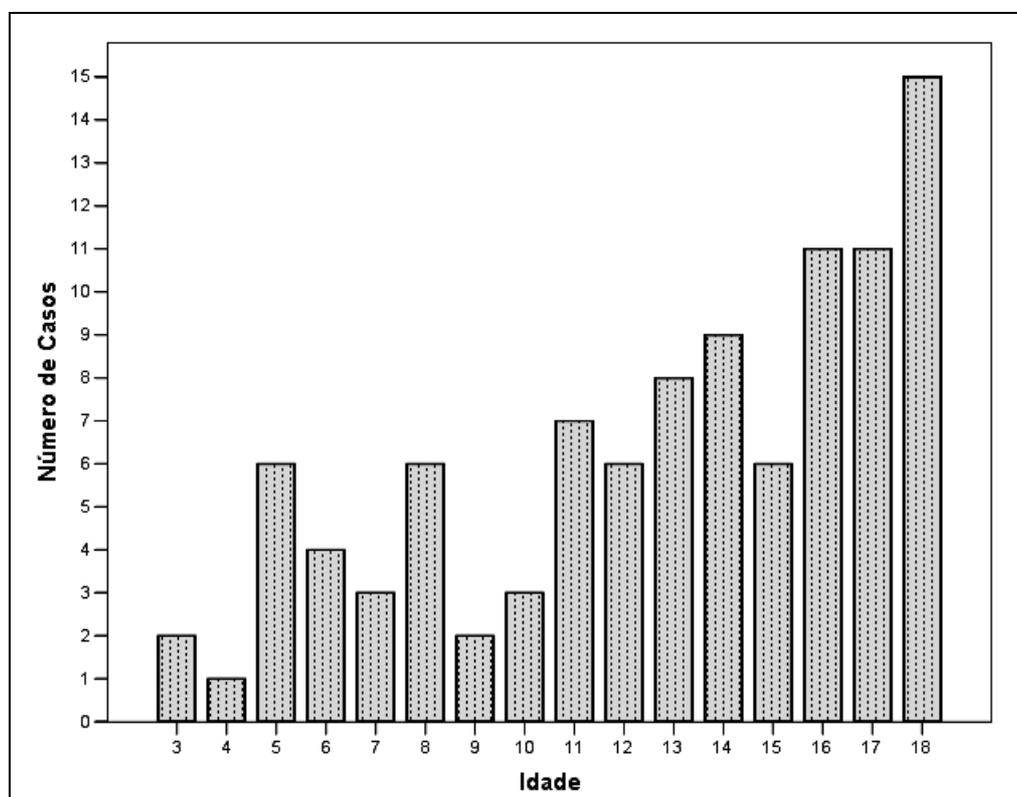


Figura 5.1: Distribuição etária dos casos incluídos no estudo. Número de casos por idade.

O intervalo compreendido entre início dos primeiros sinais/sintomas e a matrícula no INCA (intervalo diagnóstico) variou de 6 à 2190 dias (mediana 120 dias) nos 87 casos analisáveis para esta variável. Deste total, 42 (48,3%) tiveram um intervalo de mais de 120 dias.

A presença de sintomas “B” (febre, sudorese noturna e/ou perda de peso) foi observada em 51 pacientes (53,7%). O número de sítios anatômicos acometidos (SAA) pelo LHc (cadeias linfonodais, baço e/ou órgão extralinfático) foi avaliável em 95 casos e variou de 1 à 9, (mediana: 3), sendo que 37 (38,9%) pacientes tiveram 4 ou mais SAA. A massa mediastinal foi avaliável em 96 casos e esteve presente em 63 (65,6%) casos.

O estadiamento foi avaliável em 95 pacientes. Deste total, 11 foram classificados no estadio I (11,6%), 48 no estadio II (50,5%), 25 no estadio III (26,3%) e 11 no estadio IV (11,6%). A distribuição dos casos quanto ao grupo de doença (favorável vs. desfavorável) mostrou equivalência entre os grupos: 50 (52,6%) pacientes (50,8%) no grupo favorável e 45 (47,4%) no grupo desfavorável.

A leucometria foi avaliável em 96 crianças: 57 (59,4%) tiveram valores normais, 11 (11,5%) apresentaram leucopenia e 28 (29,2%) leucocitose. O valor da hemoglobina ao diagnóstico foi avaliável em 93 pacientes: 64 (68,8%) apresentaram anemia ao diagnóstico. A velocidade de hemossedimentação (VSH) foi avaliável em 68 crianças: 54 (79,4%) exibiram aumento do VSH. A DHL foi avaliável em 86 pacientes: 37 (43%) apresentaram elevação deste marcador. A tabela 5.1 mostra um resumo dos dados clínico-laboratoriais avaliáveis.

Tabela 5.1: Dados clínico-laboratoriais do grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>NÚMERO DE CASOS</b>	<b>VALOR PERCENTUAL</b>
Massa Mediastinal	Sim: 63 Não: 33 Total: 96	65,6 34,4 Total: 100
Estadiamento		
I	11	11,6
II	48	50,5
III	25	26,3
IV	11	11,6
	Total: 95	Total: 100
Sintomas B		
Não	44	46,3
Sim	51	53,7
	Total: 61	Total: 100
Grupos		
Favorável	50	52,6
Desfavorável	45	47,4
	Total: 95	Total: 100
Leucometria		
Normal	57	59,4
Diminuída	11	11,5
Aumentada	28	29,1
	Total: 96	Total: 100
Hemoglobina		
Normal	29	31,2
Diminuída	64	68,8
	Total: 93	Total: 100
VSH		
Normal	14	20,6
Aumentado	54	79,4
	Total: 68	Total: 100
DHL		
Normal	49	57
Aumentado	37	43
	Total: 86	Total: 100

VSH: velocidade de eritrossedimentação; DHL: desidrogenase láctica.

### 5.1.2 Características Histológicas

A figura 5.2 ilustra as características histológicas observadas neste estudo. A tabela 5.2 mostra um resumo das variáveis histológicas analisadas.

O subtipo EN foi o mais freqüente, representado por 69 casos (69%), seguido da CM com 23 casos (23%). Cinco casos (5%) foram considerados não

classificáveis quanto ao subtipo histológico. Nesta série, foi observado frequentemente casos de EN com pouca esclerose e ausência de células lacunares, porém mantendo os achados de espessamento capsular e, ao menos, algum foco com banda de colágeno esclerótico.

A EN grau I e grau II tiveram freqüências semelhantes: 38 (55,1%) e 31 casos (44,9%), respectivamente. Em relação ao risco da EN, 29 (44,6%) casos foram classificados como EN-BR e 36 (55,4%) como EN-AR.

O padrão interfolicular de acometimento do LHc foi encontrado em 13 casos (13%). O número de eosinófilos variou de 0 a 3600 por 10 CGA, mediana de 33 eosinófilos.

O número de células H-RS variou de 2 à 713 por 10 CGA (mediana 64 células). Já o número de células H-RS mononucleadas (NUN) variou de 3 à 129 /mm<sup>2</sup> (mediana 41 células /mm<sup>2</sup>), enquanto o número de células multinucleadas (NMN) variou de 1 à 85 /mm<sup>2</sup> (mediana 20 células /mm<sup>2</sup>)

O número de mitose nas células H-RS variou de 0 à 51 por 10 CGA. Os casos foram divididos em 2 grupos: um com até 10 mitoses por 10 CGA (grupo 1) e outro com mais de 10 mitoses por 10 CGA (grupo 2). O grupo 1 foi o predominante, representado por 88 casos (88%), enquanto o grupo 2 apresentou apenas 12 casos (12%).

O granuloma foi observado em 37% dos casos, estando associado ao menor número de células H-RS /10CGA (p= 0,007) e eosinófilos no microambiente tumoral (p= 0,048), além de ser incomum em crianças mais velhas (>10 anos) (22/73; 30,1%; p= 0,019) (Figura 5.3). Ainda, o granuloma foi menos freqüentemente associado à EN: somente 30,4% (21/69) dos casos mostraram esta característica (p= 0,009).

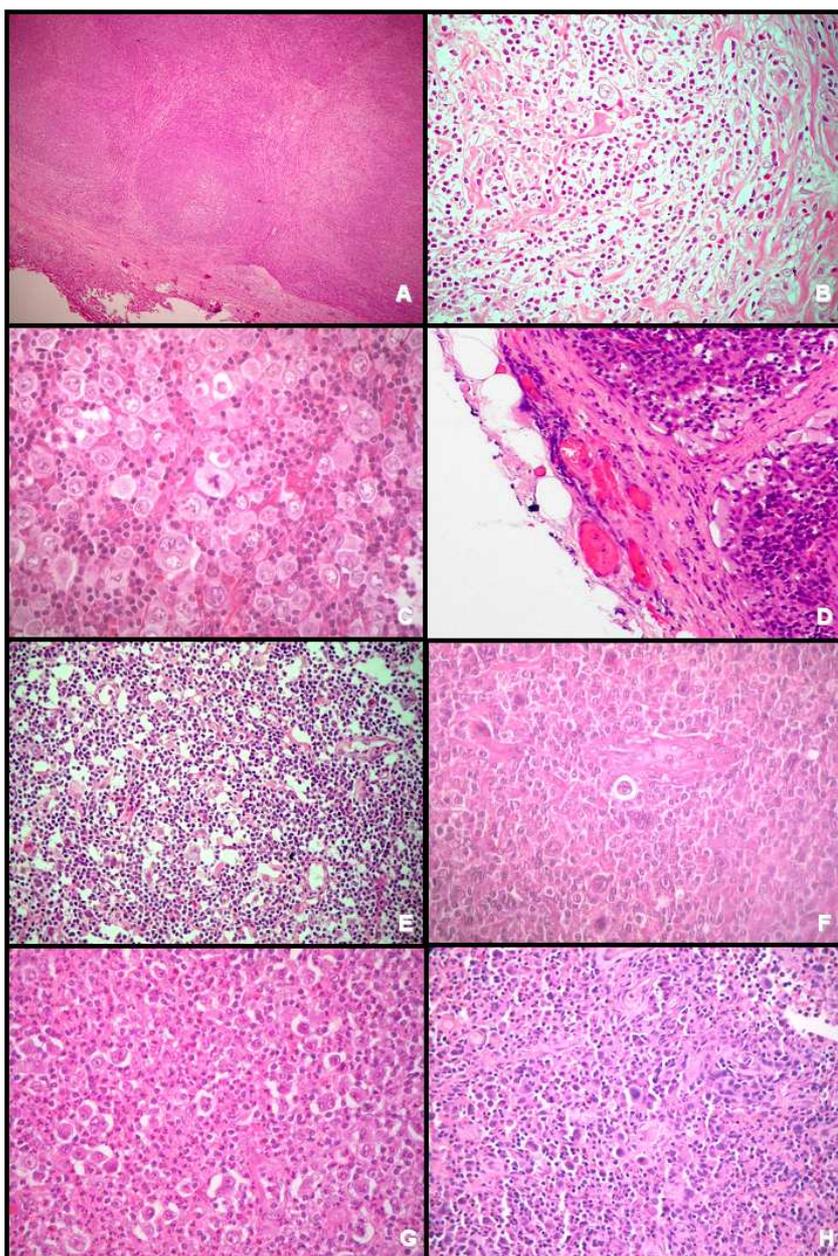


Figura 5.2: Variabilidade histológicas observada nos casos estudados. A) Linfoma de Hodgkin esclerose nodular grau II, mostrando nódulos bem formados (HE 40x), contendo traves de colágeno refringente (foto B, HE 100x) e células neoplásicas que preenchem totalmente um campo de grande aumento (foto C, HE 400x). D) Exemplo de caso de esclerose nodular (fase celular ou esclerose celular mínima) com espessamento da cápsula do linfonodo e septo de tecido conjuntivo que se dirige em direção ao interior do linfonodo (HE 400x). E) Caso representativo de celularidade mista, sendo possível notar nesta magnificação, uma ausência de esclerose linfonodal (HE, 10x). F) Linfoma de Hodgkin depleção linfocitária, mostrando grande número de células neoplásicas e pequena quantidade de linfócitos (HE, 400x). G e H) Exemplos de casos com esclerose nodular de alto risco, sendo possível observar grande número de eosinófilos (foto G, HE 400x) e células neoplásicas atípicas (foto H, HE 400x).

Tabela 5.2: Descrição dos subtipos histológicos, subtipos da esclerose nodular, grau da esclerose nodular e padrão interfolicular nos casos de linfoma de Hodgkin clássico analisados.

VARIÁVEL	NÚMERO DE CASOS	VALOR PERCENTUAL
<b>Subtipo Histológico</b>		
EN	69	69
CM	23	23
DL	1	1
RL	2	2
Inclassificável	5	5
<b>Grau da EN</b>		
I	38	55,1
II	31	44,9
<b>Risco da EN</b>		
BR	29	44,6
AR	36	55,4
<b>Padrão Interfolicular</b>		
Sim	13	13
Não	86	86
<b>Granuloma</b>		
Sim	37	37
Não	63	63

EN: Esclerose nodular. CM: Celularidade mista. DL: Depleção linfocítica. RL: Rico em linfócito. BR: Baixo risco. AR: Alto risco

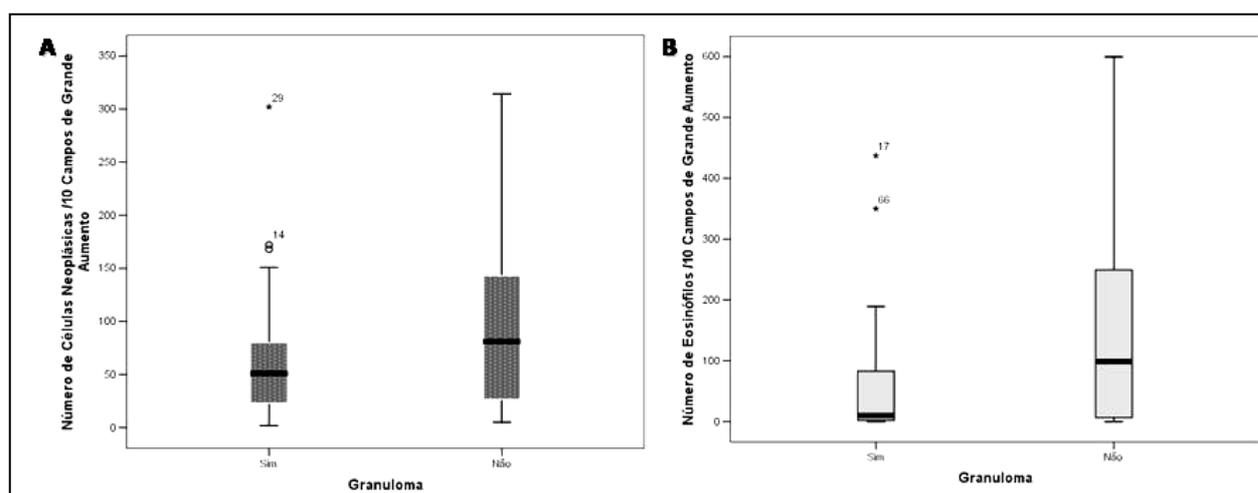


Figura 5.3: Distribuição do número de células neoplásicas (A) e do número de eosinófilos no microambiente tumoral (B) por 10 campos de grande aumento, em relação à presença de granuloma.

### 5.1.3 Perfil Imunofenotípico das Células H-RS

A imunoposição do CD30 foi observada em 92,2% dos casos (83/90), do CD15 em 88,8% (80/90) e do CD20 em 25,3% dos pacientes (23/91).

### 5.1.4 Associação com o Vírus Epstein-Barr

A hibridização *in situ* para os transcritos EBERs foi positiva em 43 dos 96 casos analisáveis (44,8%). Os casos positivos apresentaram marcação nuclear enegrecida, predominantemente, em mais de 75% das células neoplásicas (Tabela 5.3 e Figura 5.4).

A imunoposição de LMP1 foi observada 40 dos 96 casos analisáveis (41,6%), sendo característica a imunoposição em mais de 75% das células H-RS (Tabela 5.3). O padrão de marcação encontrado foi citoplasmático com raros casos expressando também o sinal paranuclear (Figura 5.4).

Tabela 5.3: Imunoposição de CD30, CD15, CD20 e presença do vírus Epstein-Barr nas células neoplásicas do linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	NÚMERO DE CASOS	VALOR PERCENTUAL
<b>CD30</b>		
Positivo	83	92,2
Negativo	7	7,8
<b>CD15</b>		
Positivo	80	88,8
Negativo	10	11,2
<b>CD20</b>		
Positivo	23	25,3
Negativo	68	74,7
<b>Vírus Epstein-Barr<sup>1</sup></b>		
Presente	43	44,8
Ausente	53	55,2

<sup>1</sup>Considerando positividade para LMP1 e EBER-ISH

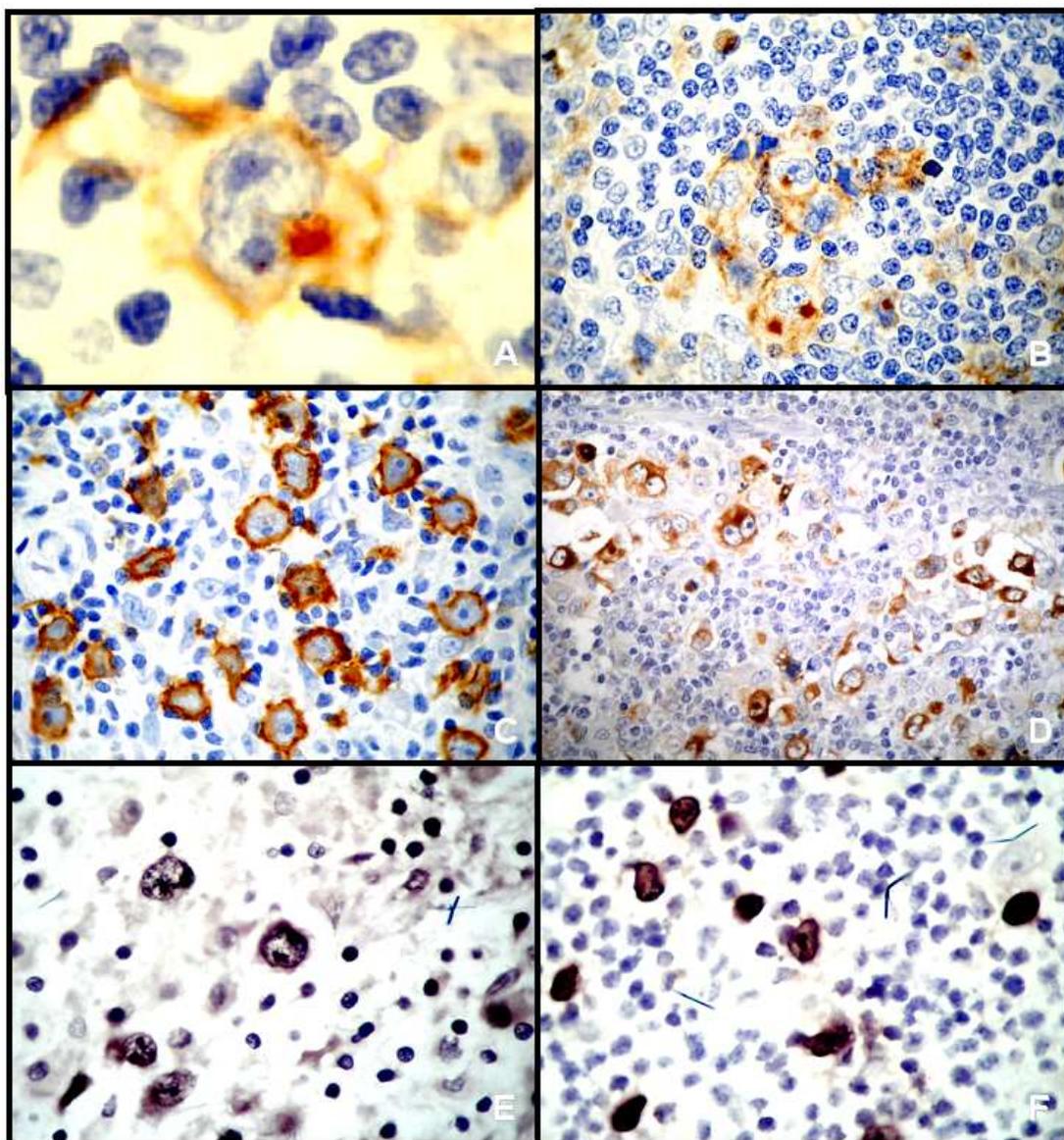


Figura 5.4: Avaliação da expressão de proteínas e RNA para determinação do fenótipo celular e associação com EBV, por imunohistoquímica e hibridização in situ. A) Célula de Reed-Sternberg expressando CD30, mostrando marcação de membrana e para-nuclear (marcação em "dot") típica (1000x). B) Células neoplásicas expressando CD15, exibindo marcação característica de membrana e para-nuclear (400x). C) Células neoplásicas expressando CD20, note-se marcação de membrana característica (400x). D) Exemplo de caso positivo para LMP1, mostrando células neoplásicas com marcação típica de citoplasma (400x). E e F) Exemplos de hibridização in situ para os RNAs virais não codificantes do EBV (1000x).

### 5.1.5 Resposta ao Tratamento

Noventa e quatro pacientes foram avaliáveis quanto ao tratamento. Apenas 1 paciente foi tratado exclusivamente com radioterapia (estadio IA com apenas 1 linfonodo acometido). O restante dos 93 pacientes recebeu poliquimioterapia, sendo o protocolo HD-90 do Grupo Cooperativo Alemão para Tratamento do Linfoma de Hodgkin na Infância<sup>181-182</sup> o mais utilizado (47/93, 50%), seguido do ABVD Infância<sup>181-182</sup> que foi utilizado por 45% (42/93) dos pacientes. Os outros 4 pacientes (5%) receberam outro esquema quimioterápico baseado na administração de antracíclicos.

A resposta ao tratamento foi avaliável em 93 crianças: 71 (76,3%) terminaram o tratamento e recaíram, enquanto 18 (19,35%) recaíram após o término do tratamento e 4 (4,35%) tiveram progressão da doença durante o tratamento. A média de seguimento foi de 68 meses (1 a 129 meses), tendo o paciente mais recentemente admitido 27 meses de seguimento.

A SG aos 24 e 60 meses foi de 95% e 88%, respectivamente. A SLE para o mesmo período foi de 86% e 78%, respectivamente (Figura 5.5). Nenhuma diferença foi observada entre os protocolos de tratamento utilizados neste estudo ( $p= 0,2$ , Log-rank).

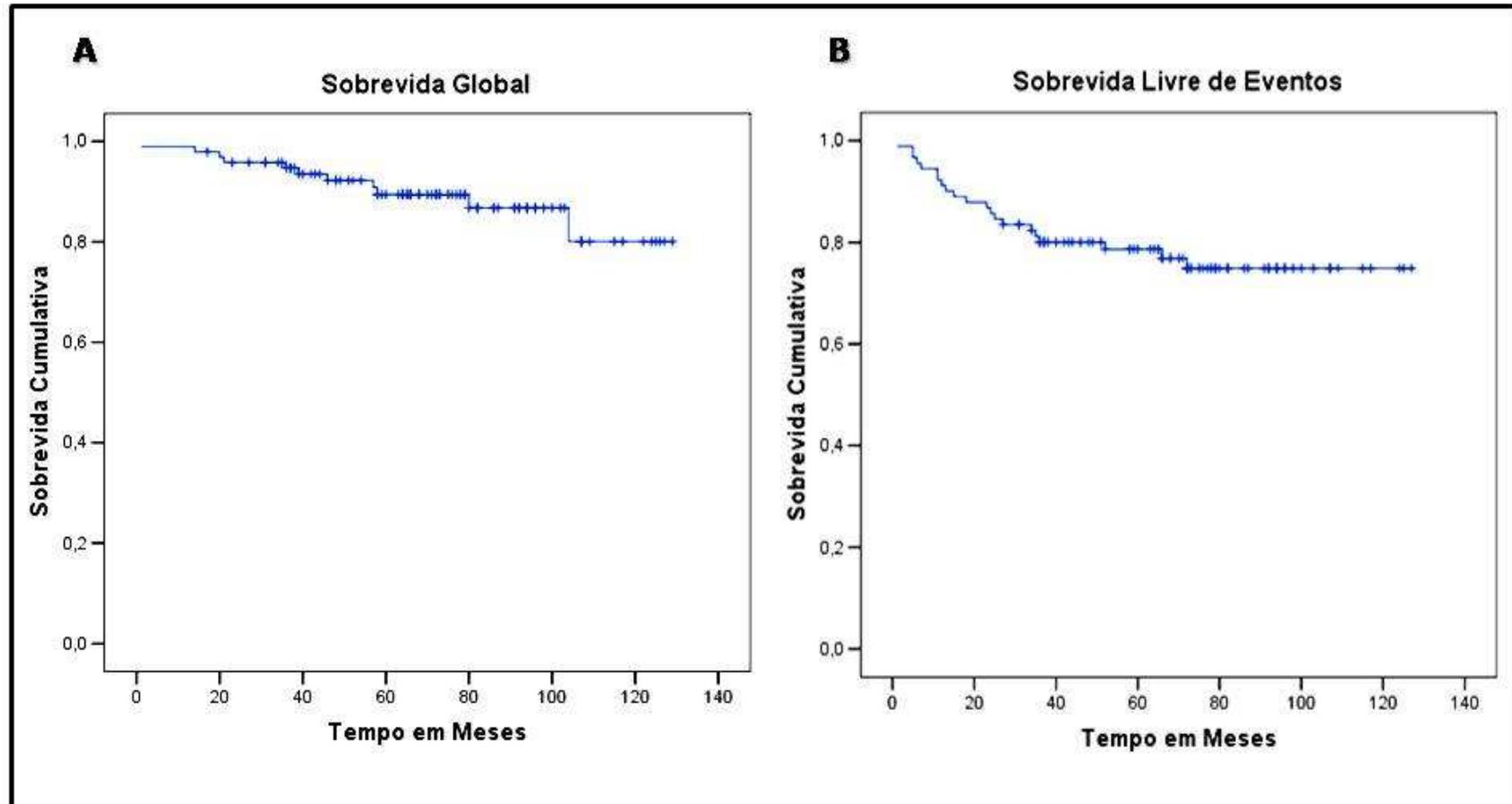


Figura 5.5: Sobrevida global (A) e sobrevida livre de eventos (B) nos 94 casos de linfoma de Hodgkin clássico analisáveis.

## 5.2 Linfoma de Hodgkin Clássico no Rio de Janeiro: Um Padrão Epidemiológico Distinto

A análise da distribuição etária revelou uma frequência menor de casos com idades  $\leq 10$  anos, e uma tendência ao aumento do número absoluto de casos conforme a idade, em direção ao pico de adultos jovens, como observado na Figura 5.1.

A análise dos subtipos histológicos em relação à idade mostrou que a CM foi igualmente distribuída em crianças com até 10 anos (12/23) e maiores de 10 anos (11/23). Já 81,2% dos casos de EN (56/69) foram diagnosticados predominantemente em crianças  $>10$  anos ( $p= 0,006$ ) (Tabela 5.4).

A presença do EBV não foi associada a nenhum grupo etário (Tabela 5.4). Como esperado, o EBV foi mais prevalente nos casos de CM (15 de 22 casos, 68,2%;  $p= 0,015$ ), porém os casos de EN foram também frequentemente associados ao EBV (26/67; 38,85%) (Tabela 5.4).

Uma correlação significativa entre o EBV e o sexo masculino foi observada: 54,1% (33/61) dos casos masculinos estavam associados ao vírus, em comparação a apenas 28,6% (10/35) dos casos femininos ( $p= 0,015$ ;  $\chi^2$ ). Esta associação não foi secundária à distribuição histológica entre crianças de sexo feminino e masculino.

Tabela 5.4: Características clínicas e histológicas do linfoma de Hodgkin clássico pediátrico de acordo com a associação com o vírus Epstein-Barr e o subtipo histológico celularidade mista.

	VÍRUS EPSTEIN-BARR <sup>1</sup>		P	CELULARIDADE MISTA		P
	PRESENTE (%)	AUSENTE (%)		SIM (%)	NÃO (%)	
<b>Idade</b>						
≤10 anos	15/43 (34,9)	12/53 (22,6)		12/23 (55,2)	15/77 (19,5)	
>10 anos	28/43 (65,1)	41/53 (55,2)	0.18	11/23 (47,8)	62/77 (80,5)	0.002
<b>Gênero</b>						
Masculino	33/43 (76,7)	28/53 (52,8)		16/23 (69,6)	48/77 (62,3)	
Feminino	10/43 (23,3)	25/53 (47,2)	0.015	7/23 (30,4)	29/77 (37,7)	0.6
<b>Subtipo Histológico</b>						
EN	26/43 (60,5)	41/53 (77,4)				
CM	15/43 (34,9)	7/53 (13,2)		NA	NA	NA
DL	1/43 (2,3)	0/53 (0)				
RL	0/43 (0)	2/53 (3,8)				
Inclassificável	1/43 (2,3)	3/53 (5,7)	0.019 <sup>2</sup>			
<b>Grau EM</b>						
Grau I	17/26 (65,4)	20/41 (48,8)		NA	NA	NA
Grau II	9/26 (34,6)	21/41 (51,2)	0.18			

<sup>1</sup>Vírus Epstein-Barr avaliado em 96/100 casos. <sup>2</sup>Significância obtida na comparação entre esclerose nodular e celularidade mista. EN: esclerose nodular; CM: celularidade mista; DL: depleção linfocitária, RL: rico em linfócitos; NA: não aplicável.

### 5.3 O Microambiente Tumoral no LHc Pediátrico

#### 5.3.1 Subpopulações linfocitárias no microambiente tumoral

O microambiente tumoral do LHc pediátrico foi caracterizado por um grande infiltrado de linfócitos T CD3+ em comparação ao número de linfócitos B CD20+ (mediana de 645 células/mm<sup>2</sup> vs. 143 células/mm<sup>2</sup>, respectivamente) e uma

freqüência equivalente de linfócitos T CD4+ e CD8+ (mediana de 155 células/mm<sup>2</sup> vs. 143 células/mm<sup>2</sup>, respectivamente). Quanto à diferenciação dos subtipos de células T CD4+, houve mais células C-maf+ (Th2) em comparação ao número de células T-bet+ (Th1) (mediana 68,5 células /mm<sup>2</sup> vs. 32 células/mm<sup>2</sup>, respectivamente). Em relação ao grau de maturação da função citotóxica, foi observado um número maior de linfócitos expressando Tia-1+ em comparação ao número de linfócitos Granzima B+ (mediana de 69 células/mm<sup>2</sup> vs. 11 células/mm<sup>2</sup>, respectivamente). A tabela 5.5 e as figuras 5.6 à 5.8 mostram a caracterização das subpopulações celulares acima referidas.

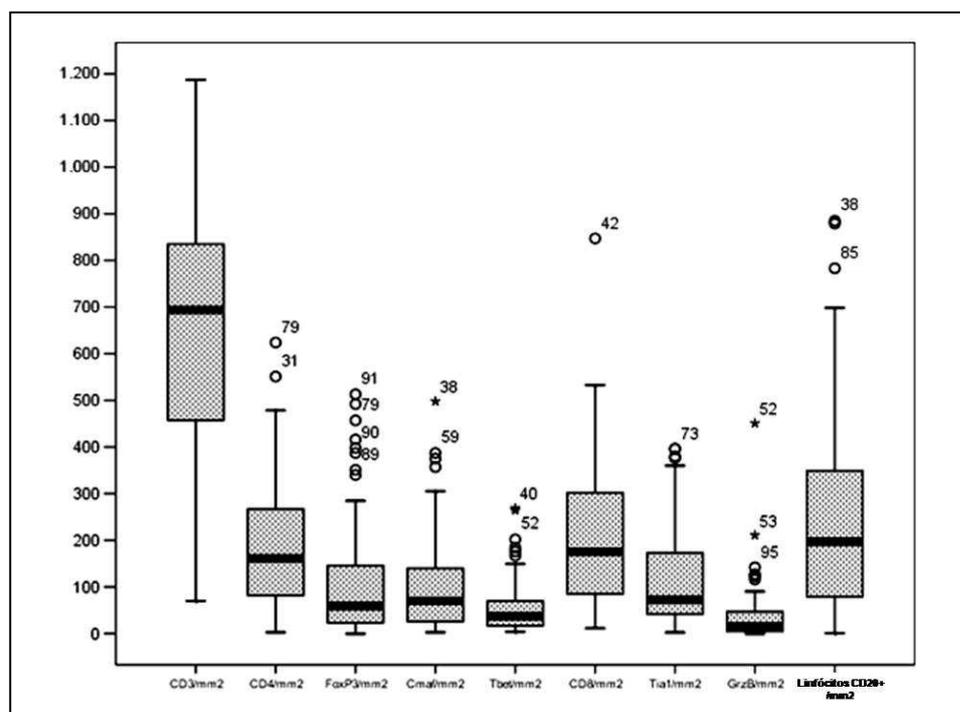


Figura 5.6: Gráfico de tipo “Box plot” mostrando a distribuição das subpopulações linfocitárias do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico pediátrico.

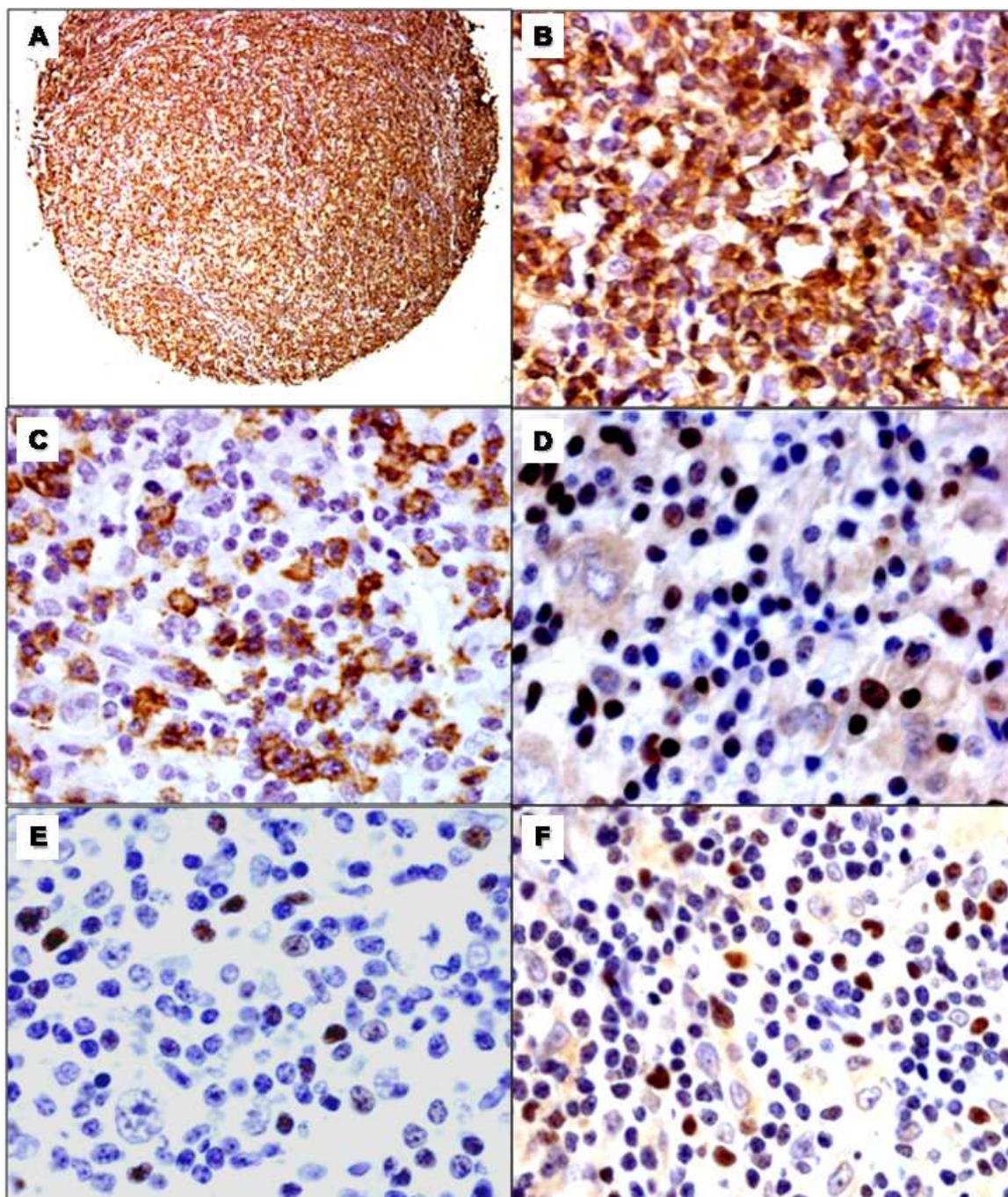


Figura 5.7: Caracterização dos linfócitos do microambiente tumoral do LHC pediátrico. A) Exemplo típico de caso de LHC com grande número de linfócitos T CD3+ no microambiente tumoral. Neste exemplo, é possível perceber que estes linfócitos ocupam a quase totalidade do core (Aumento original: 100x). B) Detalhe da imagem anterior mostrando o grande número de linfócitos T CD3+ (Aumento original: 400x). C) Linfócitos T CD4+ (Aumento original: 400x). D) Linfócitos e células neoplásicas com positividade para T-bet+ (Aumento original: 400x). E) Linfócitos C-maf+ (Aumento original: 400x). F) Linfócitos FoxP3+ (Aumento original: 400x).

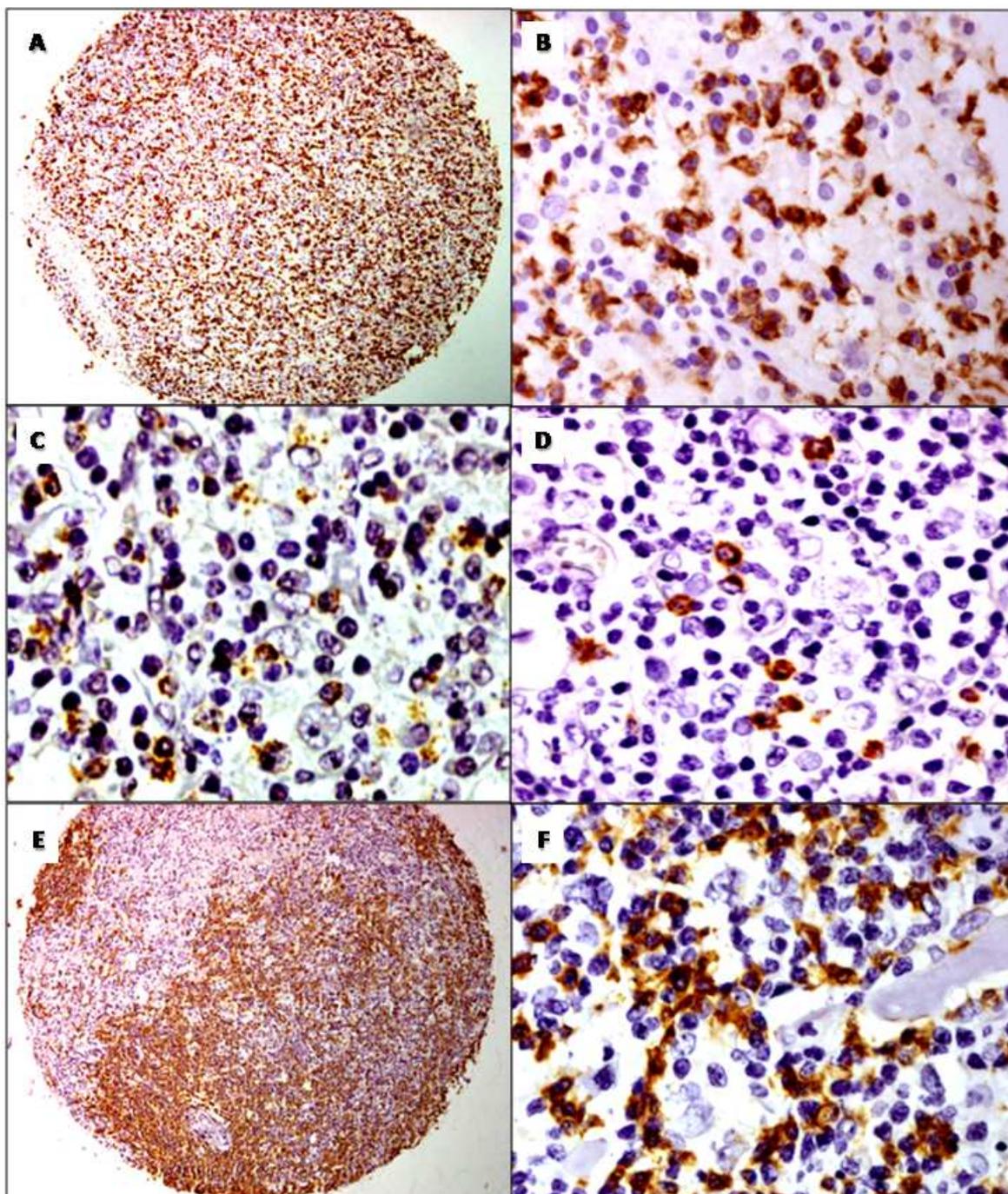


Figura 5.8: Caracterização dos linfócitos do microambiente tumoral do LHC pediátrico. A) Exemplo de caso com grande número de linfócitos T CD8+. É possível observar que estes linfócitos ocupam a quase totalidade do core (Aumento original: 100x). B) Detalhe da imagem anterior mostrando grande número de linfócitos T CD8+ (Aumento original: 400x). C) Linfócitos Tia-1+. É possível observar que alguns destes linfócitos estão em contato com as células neoplásicas (Aumento original: 400x). D) Linfócitos Granzima B+. É possível observar que alguns destes linfócitos estão próximos às células neoplásicas (Aumento original: 400x). E) Exemplo de caso com grande número de linfócitos CD20+ (Aumento original: 100x). F) Linfócitos CD20+ (Aumento original: 400x).

Tabela 5.5: Descrição da população de linfócitos do microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin clássico na infância, neste estudo.

VARIÁVEL	CARACTERÍSTICAS	FREQUENCIA (%)
<b>CD3 (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	70 a 1187	
Média / Mediana	643,43 / 645	
> 451 (percentil 25)		61/83 (73,5)
> 645 (percentil 50)		41/83 (49,4)
<b>CD4 (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	1 a 624	
Média / Mediana	180,02 / 155	
> 70 (percentil 25)		62/83 (74,7)
> 155 (percentil 50)		41/83 (49,4)
<b>FoxP3 (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	1 a 513	
Média / Mediana	101,64 / 49	
> 12 (percentil 25)		63/84 (75)
> 49 (percentil 50)		40/84 (47,6)
<b>C-maf (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	3 a 498	
Média / Mediana	98,82 / 68	
> 70 (percentil 25)		57/76 (75)
> 155 (percentil 50)		38/76 (50)
<b>T-bet (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	2 a 269	
Média / Mediana	54,93/ 32	
> 70 (percentil 25)		61/81 (75,3)
> 155 (percentil 50)		40/81 (49,4)
<b>CD8 (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	11 a 847	
Média / Mediana	185,26 / 143	
> 76 (percentil 25)		64/86 (74,4)
> 143 (percentil 50)		42/86 (48,8)
<b>Tia-1 (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	1 a 396	
Média / Mediana	113,64 / 69	
> 39 (percentil 25)		61/81 (75,3)
> 69 (percentil 50)		40/81 (49,4)
<b>Granzima B (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	1 a 451	
Média / Mediana	32,07 / 11	
> 4 (percentil 25)		61/85 (71,8)
> 11 (percentil 50)		41/85 (48,2)
<b>CD20 (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	1 a 885	
Média / Mediana	240,86 / 196	
> 79 (percentil 25)		62/83 (74,7)
> 196 (percentil 50)		41/83 (49,4)
<b>Linfócitos Ki67+ (células/mm<sup>2</sup>)</b>		
Variação	3 a 352	
Média / Mediana	99,49 / 91	
> 44 (percentil 25)		63/85 (74,1)
> 91 (percentil 50)		42/85 (49,4)

Os valores numéricos da coluna “características” referem-se a valores absolutos por unidade de área (número de células /mm<sup>2</sup>), enquanto que a coluna frequência inclui os valores percentuais de casos acima dos percentis 25 e 50 da distribuição.

### 5.3.1.1 Linfócitos T CD3+

Os linfócitos T CD3+ tiveram distribuição difusa pelo linfonodo. Um baixo número destas células/mm<sup>2</sup> foi associado com características histológicas e clínicas

desfavoráveis: >36 eosinófilos /10CGA ( $p= 0,011$ ; Teste de Mann-Whitney), idade  $\leq 10$  anos ( $p= 0,025$ ), massa mediastinal ( $p= 0,042$ ), >4 SAA ( $p < 0,0005$ ), presença de sintomas B ( $p= 0,004$ ), altos estádios ( $p= 0,004$ ), doença desfavorável ( $p= 0,004$ ), linfopenia ( $p= 0,01$ ), anemia ( $p= 0,021$ ) e VSH elevado ( $p= 0,005$ ).

Na análise multivariada, sintomas B ( $p= 0,017$ ; IC95% -276,1 até -29,14) e alto estadiamento ( $p= 0,042$ ; IC95% -450,2 até -8,3) mantiveram associação estatística com o número de linfócitos T CD3+ (Tabela 5.6).

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $> 10$  anos é mostrada nas figuras 5.9 e 5.10.

#### **5.3.1.2 Linfócitos T CD4+**

Estas células apresentaram uma distribuição difusa pelo linfonodo, algumas vezes formando rosetas ao redor das células H-RS. Um maior número destes linfócitos/mm<sup>2</sup> esteve associado ao baixo estadiamento ( $p= 0,005$ ; Teste de Mann-Whitney) e a ausência de linfopenia ( $p= 0,001$ ). Na análise multivariada, o número de linfócitos T CD4+ manteve a associação estatística com a ausência de linfopenia ( $p= 0,014$ ; IC95% 17,2 até 146,5) (Tabela 5.6).

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $> 10$  anos é mostrada nas figuras 5.9 e 5.11.

#### **5.3.1.3 Linfócitos FoxP3+**

Os linfócitos FoxP3+ mostraram distribuição difusa pelo linfonodo, sem uma localização preferencial. O número destas células não esteve associado às características epidemiológicas, histológicas e clínicas analisadas.

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $> 10$  anos é mostrada na figuras 5.9.

#### **5.3.1.4 Linfócitos T-bet+**

Esta subpopulação celular teve distribuição difusa em todo o microambiente tumoral. Um alto número destas células foi associado a idade  $\leq 10$  anos ( $p= 0,045$ ; Teste de Mann-Whitney), EN GI ( $p= 0,004$ ) e presença do EBV ( $p= 0,031$ ). Na análise multivariada, o grau da EN manteve a significância estatística ( $p= 0,036$ ; IC95% -70,2 até -2,4) (Tabela 5.6).

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $> 10$  anos é mostrada nas figuras 5.9 e 5.10.

#### **5.3.1.5 Linfócitos C-maf+**

Assim como descrito para os linfócitos T-bet+, não houve qualquer distribuição topográfica característica. Um grande número de linfócitos C-maf+ foi observado nos casos com mais de 65 células neoplásicas /10CG ( $p= 0,048$ ; Teste de Mann-Whitney),  $\leq 36$  eosinófilos /10CGA ( $p= 0,017$ ),  $< 4$  SAA ( $p= 0,032$ ) e baixo estadiamento ( $p= 0,003$ ).

Na análise multivariada, o número de linfócitos C-maf+ manteve a significância estatística com o baixo número de eosinófilos ( $p= 0,043$ ; IC95% -97,3 até -1,6) (Tabela 5.6).

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $> 10$  anos é mostrada nas figuras 5.9.

### 5.3.1.6 Linfócitos CD8+

Estas células não tiveram distribuição específica no microambiente tumoral. Um maior número destes linfócitos foi observado em crianças com padrão interfolicular ( $p= 0,024$ ; Teste de Mann-Whitney), EN GI ( $p= 0,03$ ), EN BR, ( $p= 0,005$ ),  $\leq 36$  eosinófilos /10CGA ( $p= 0,017$ ), associadas ao EBV ( $p= 0,001$ ), sexo masculino ( $p= 0,002$ ), idade  $\leq 10$  anos ( $p= 0,016$ ),  $<4$  SAA ( $p= 0,008$ ) e ausência de massa mediastinal ( $p= 0,001$ ) (Tabela 5.7). Na análise multivariada, a baixa idade manteve a significância estatística ( $p= 0.033$ ; IC95% -228,0 até -10,4) (Tabela 5.6).

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $>10$  anos é mostrada nas figuras 5.9 e 5.10.

### 5.3.1.7 Linfócitos Tia-1+ e Granzima B+

Estas células mostraram distribuição difusa no microambiente tumoral, algumas vezes na vizinhança das células H-RS. Um alto número de linfócitos Tia-1+/mm<sup>2</sup> foi associado ao padrão interfolicular ( $p= 0,037$ ; Teste de Mann-Whitney), EN GI ( $p= 0,029$ ), EN BR ( $p < 0,0005$ ),  $\leq 36$  eosinófilos /10CGA ( $p= 0,05$ ), a presença do EBV ( $p= 0,002$ , Mann-Whitney) e idade  $\leq 10$  anos ( $p= 0,008$ ). Na análise multivariada, o número de linfócitos Tia-1+ manteve a associação estatística com o risco da EN ( $p= 0,005$ ; IC95% -148,6 até -28,2) (Tabela 5.6).

Elevado número de linfócitos Granzima B+ foi observado nos casos de CM ( $p= 0,019$ ; Teste de Mann-Whitney), EN GI, ( $p= 0,013$ ),  $\leq 36$  eosinófilos /10CGA ( $p= 0,034$ ), EBV+ ( $p= 0,002$ ), sexo masculino ( $p= 0,008$ ). Na análise multivariada, nenhuma significância estatística foi mantida (Tabela 5.6).

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $>10$  anos é mostrada na figura 5.9.

### 5.3.1.8 Linfócitos CD20+

Estes linfócitos B mostraram distribuição difusa no linfonodo, similarmente às outras populações celulares descritas. Elevado número destas células foi observado na CM ( $p= 0,046$ ; Teste de Mann-Whitney), padrão interfolicular ( $p= 0,003$ ) e presença do granuloma ( $p= 0,05$ ). Na análise multivariada, o padrão interfolicular ( $p= 0,001$ , IC95% -328.1 até -92) manteve a associação estatística, enquanto a CM mostrou significância limítrofe ( $p= 0,091$ ; IC95% -175.8 até 13.3) (Tabela 5.7).

A distribuição desta população celular de acordo com os grupos etários  $\leq 10$  anos e  $>10$  anos é mostrada nas figuras 5.9 e 5.10.

### 5.3.1.9 Linfócitos FoxP3+Granzima B+

A dupla marcação para FoxP3 e Granzima B identificou uma população de células Tregs capazes de exercer citotoxicidade em apenas 10 casos de LHc pediátrico. O número destas células foi pequeno, variando de 1 a 5 células /mm<sup>2</sup> (mediana de 1 célula/mm<sup>2</sup>) (Figura 5.12). Os casos com esta população celular foram associados a um elevado número de linfócitos CD4+ ( $p < 0,0005$ ; Teste de Mann-Whitney), CD8+ ( $p= 0,004$ ) e Tia-1+ ( $p= 0,034$ ).

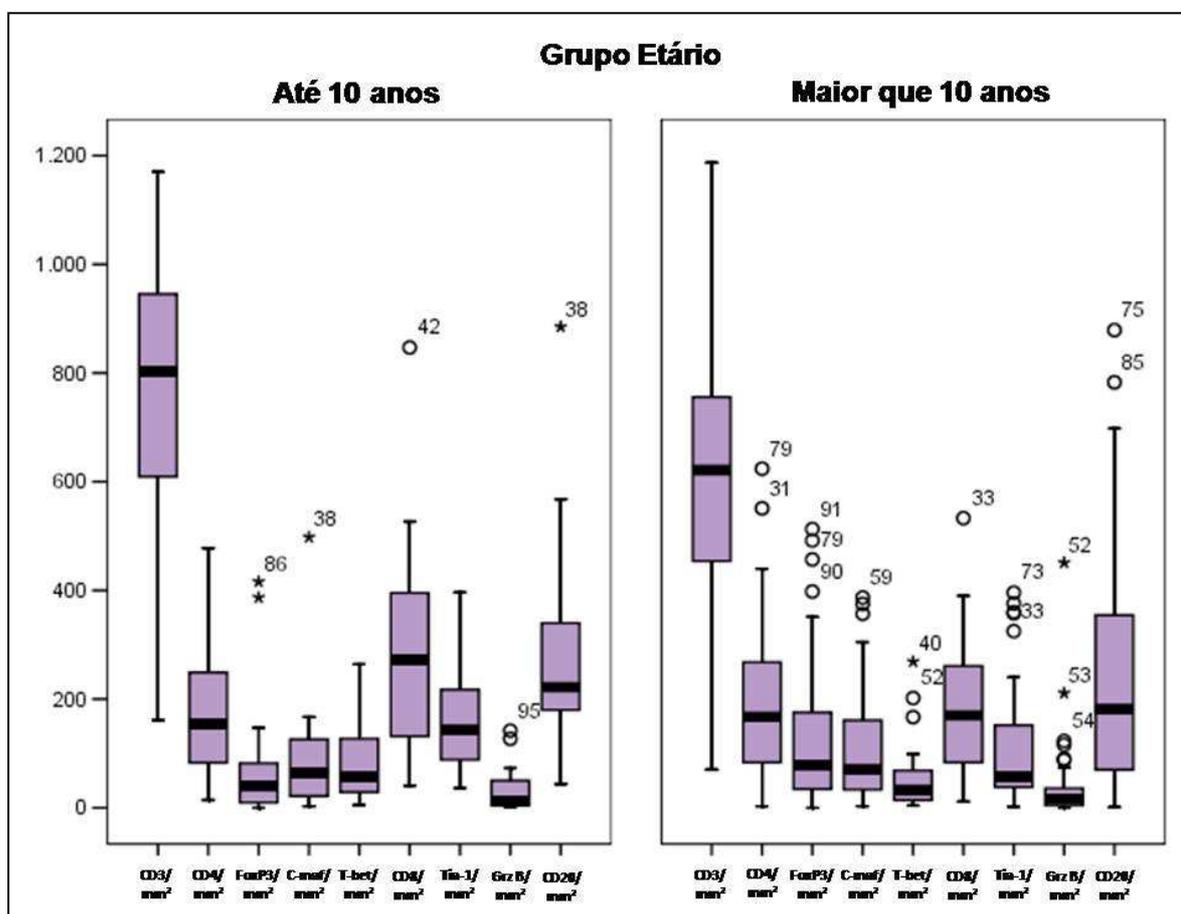


Figura 5.9: Distribuição das sub-populações linfocitárias do microambiente tumoral quanto aos grupos etários do LHc pediátrico. As crianças com até 10 anos mostraram maior número de linfócitos T-bet+, CD8+ e Tia-1+. Na análise multivariada, a significância foi mantida com o número de linfócitos CD8+ ( $p=0,015$ ; IC95% -0,001 até 0,00).

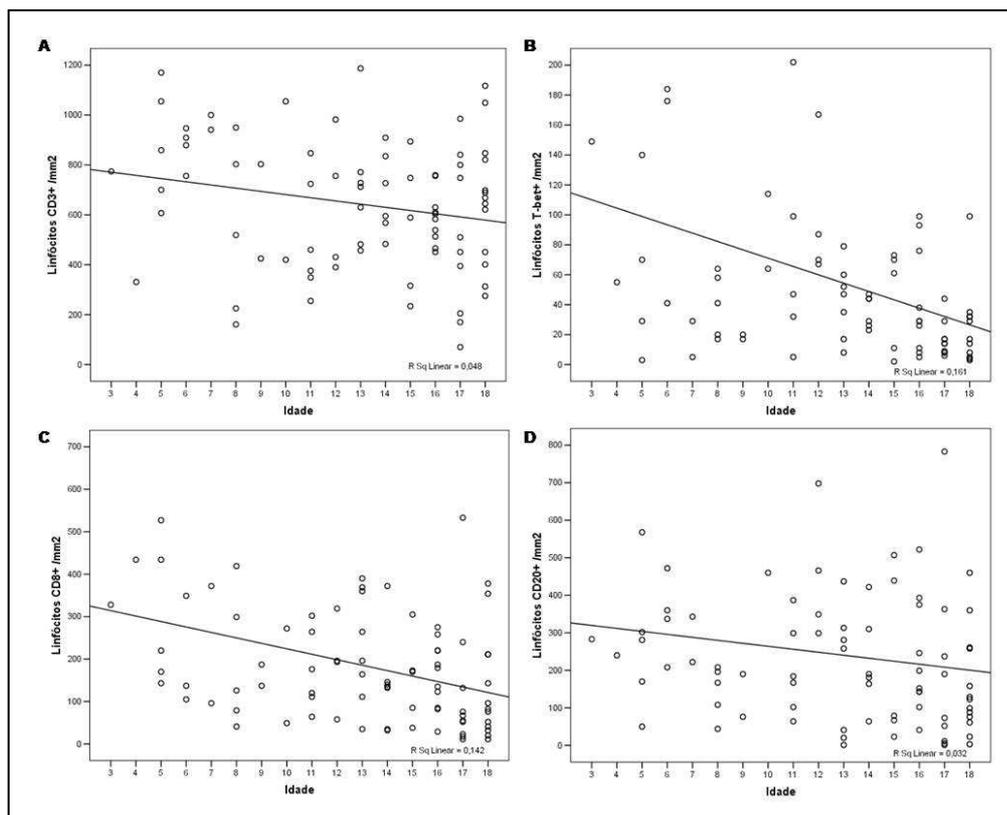


Figura 5.10: Correlação entre idade o número de linfócitos CD3+ ( $p= 0,08$ ; correlação de Spearman) (A); T-bet+ ( $p< 0,0005$ ) (B); CD8+ ( $p< 0,0005$ ) (C) e CD20+ ( $p= 0,015$ ) (D).

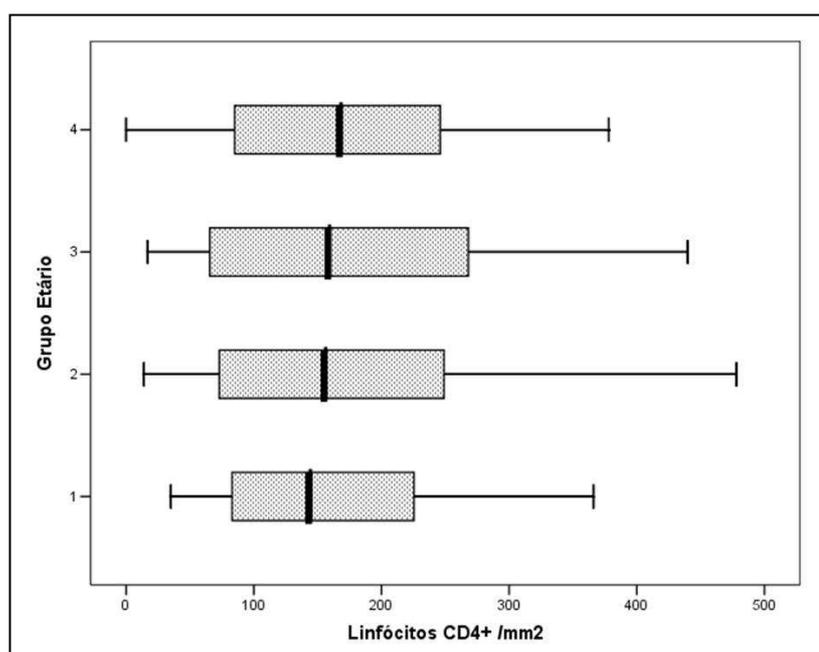


Figura 5.11: Distribuição do número de linfócitos CD4+ /mm2 em relação aos grupos etários: 1) 3 à 5 anos; 2) 6 à 10 anos; 3) 11 à 15 anos; 4) 16 à 18 anos.

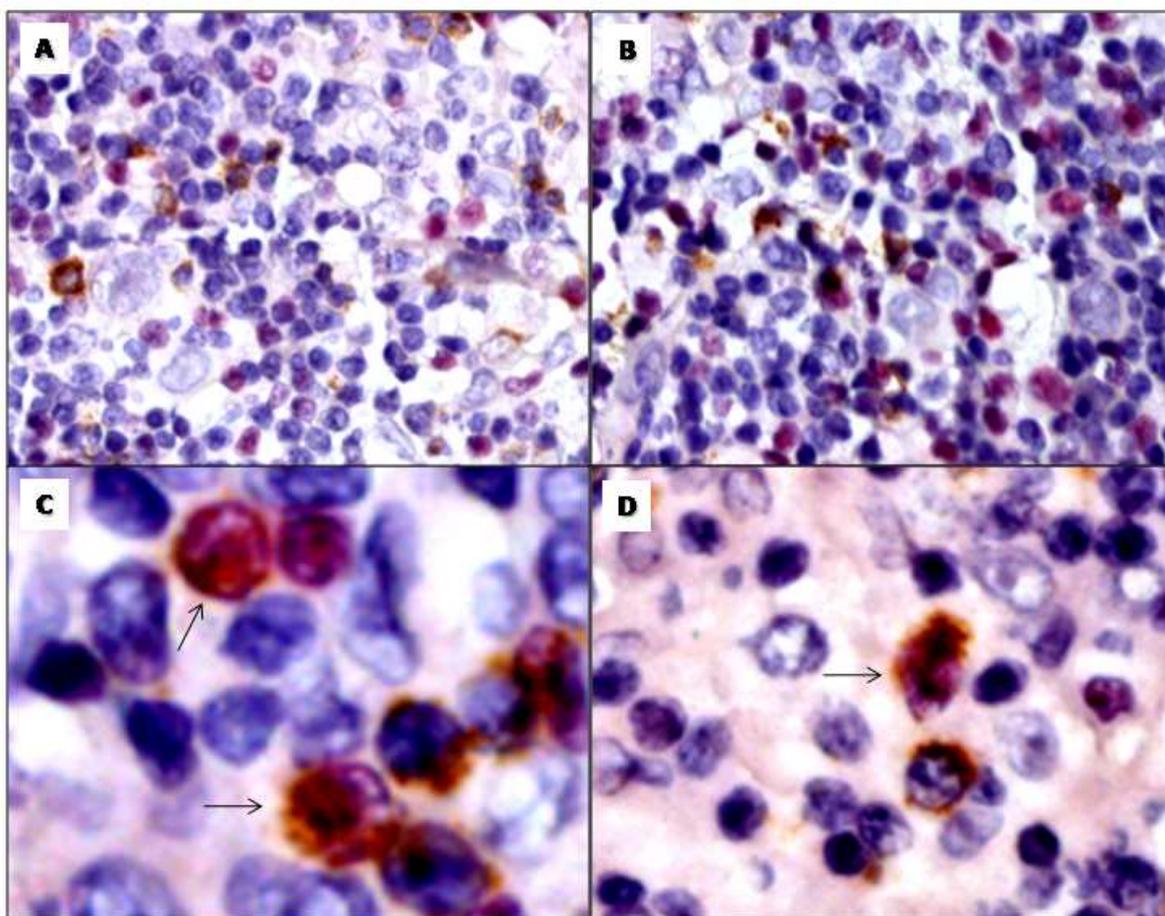


Figura 5.12: Exemplos de dupla marcação para Granzima B (castanho) e FoxP3 (vermelho). Em “A” e “B” é possível observar 2 populações celulares distintas quanto a expressão destes anticorpos (Aumento original: 400x). Em “A”, é possível ainda observar um linfócito Granzima B+ em contato com uma célula de Hodgkin. Em “C” e “D” as setas apontam para células FoxP3+ que também imunoexpressam Granzima B (Aumento original: 400x).

Tabela 5.6: Análise multivariada das características biológicas associadas estatisticamente com o número de linfócitos do microambiente tumoral.

VARIÁVEIS	P	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
		Limite Inferior	Limite Superior
<b>Linfócitos CD3+ /mm<sup>2</sup></b>			
>36 eosinófilos /10CGA	0,5	-176,9	101,8
≤ 10 anos	0,6	-185,7	110,8
Massa de mediastino	0,6	-114,9	183,0
> 4SAA	0,5	-281,3	163,9
Sintomas B	0,017	-276,1	-29,1
Alto estadiamento	0,042	-450,2	-8,3
Doença desfavorável	0,3	-92,0	230,5
Linfopenia	0,4	-85,6	191,3
Anemia	0,2	-52,2	228,4
VSH elevado	0,1	-49,6	296,0
<b>Linfócitos CD4+ /mm<sup>2</sup></b>			
Baixo estadiamento	0,1	-151,1	30,1
<4 SAA	0,8	-100,8	81,5
Sintomas B	0,2	-94,5	21,1
Linfopenia	0,014	17,2	146,5
<b>Linfócitos T-bet+ /mm<sup>2</sup></b>			
≤10 anos	0,1	-75,4	12,3
EN GI	0,036	-70,2	-2,4
Associação com EBV	0,4	-45,8	20,7
Granuloma	0,2	-53,3	15,1
<4 SAA	0,083	-3,9	61,2
<b>Linfócitos C-maf+ /mm<sup>2</sup></b>			
≥65 células H-RS	0,2	-74,4	19,9
≤36 eosinófilos /10CGA	0,043	-97,3	-1,6
<4 SAA	0,6	-57,4	92,7
Baixo estadiamento	0,6	-96,6	58,0
<b>Linfócitos CD8+ /mm<sup>2</sup></b>			
Padrão interfolicular	0,1	-43,2	204,6
EN GI	0,9	-90,3	99,4
EN BR	0,1	-165,9	26,4
≤36 eosinófilos /10CGA	0,2	-138,0	38,3
Associação com o EBV	0,1	-158,7	30,2
Sexo masculino	0,2	-138,3	41,53
<4 SAA	0,1	-21,1	129,5
Massa de mediastino	0,5	-63,9	117,2
<b>Linfócitos Tia-1+ /mm<sup>2</sup></b>			
Padrão interfolicular	0,3	-112,8	40,0
EN GI	0,5	-38,7	72,3
EN BR	0,005	-148,5	-28,2
≤36 eosinófilos /10CGA	0,3	-73,7	29,2
Associação com o EBV	0,9	-56,1	63,3
≤10 anos	0,1	-108,7	13,2
<b>Linfócitos Granzima B /mm<sup>2</sup></b>			
Celularidade mista <sup>1</sup>	NA	NA	NA
EN GI	0,2	-57,9	13,7
≤36 eosinófilos /10CGA	0,4	-52,3	25,5
Associação com o EBV	0,1	-72,7	8,9
Sexo masculino	0,9	-39,7	43,6

Tabela 5.6 (continuação): Análise multivariada das características biológicas associadas estatisticamente com o número de linfócitos do microambiente tumoral.

VARIÁVEIS	P	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
		Limite Inferior	Limite Superior
<b>Linfócitos CD20+ /mm<sup>2</sup></b>			
Celularidade mista	0,09	-175,8	13,3
Padrão interfolicular	0,001	-328,1	-92,0
Granuloma	0,7	-99,8	69,8

<sup>1</sup>Celularidade mista retirada da equação pelo programa SPSS por exibir correlação constante. CGA: campo de grande aumento. SAA: sítios anatômicos acometidos. VSH: velocidade de eritrossedimentação. EN GI: esclerose nodular grau I. EN BR: esclerose nodular baixo risco. EBV: vírus Epstein-Barr.

### 5.3.1.10 Proliferação dos Linfócitos do Microambiente Tumoral

A proliferação dos linfócitos benignos no microambiente tumoral foi avaliada pela imunomarcagem da proteína Ki67 expressa nestas células.

Um elevado número de linfócitos benignos Ki67+/mm<sup>2</sup> foi achado nos casos de EN GI (p= 0,001; Teste de Mann-Whitney), EN BR (p= 0,026), baixo estadiamento (p= 0,026) e idade ≤10 anos (p= 0,015).

Em relação às subpopulações linfocitárias infiltrantes, foi observada uma correlação direta entre o número dos linfócitos proliferantes (Ki67+) e o número de linfócitos FoxP3+ (p= 0,042; correlação de Spearman), CD8+ (p< 0,0005), Tia-1+ (p= 0,015), Granzima B+ (p< 0,0005), T-bet+ (p< 0,0005) e C-maf+ (p< 0,0005) (Figuras 5.13 e 5.14).

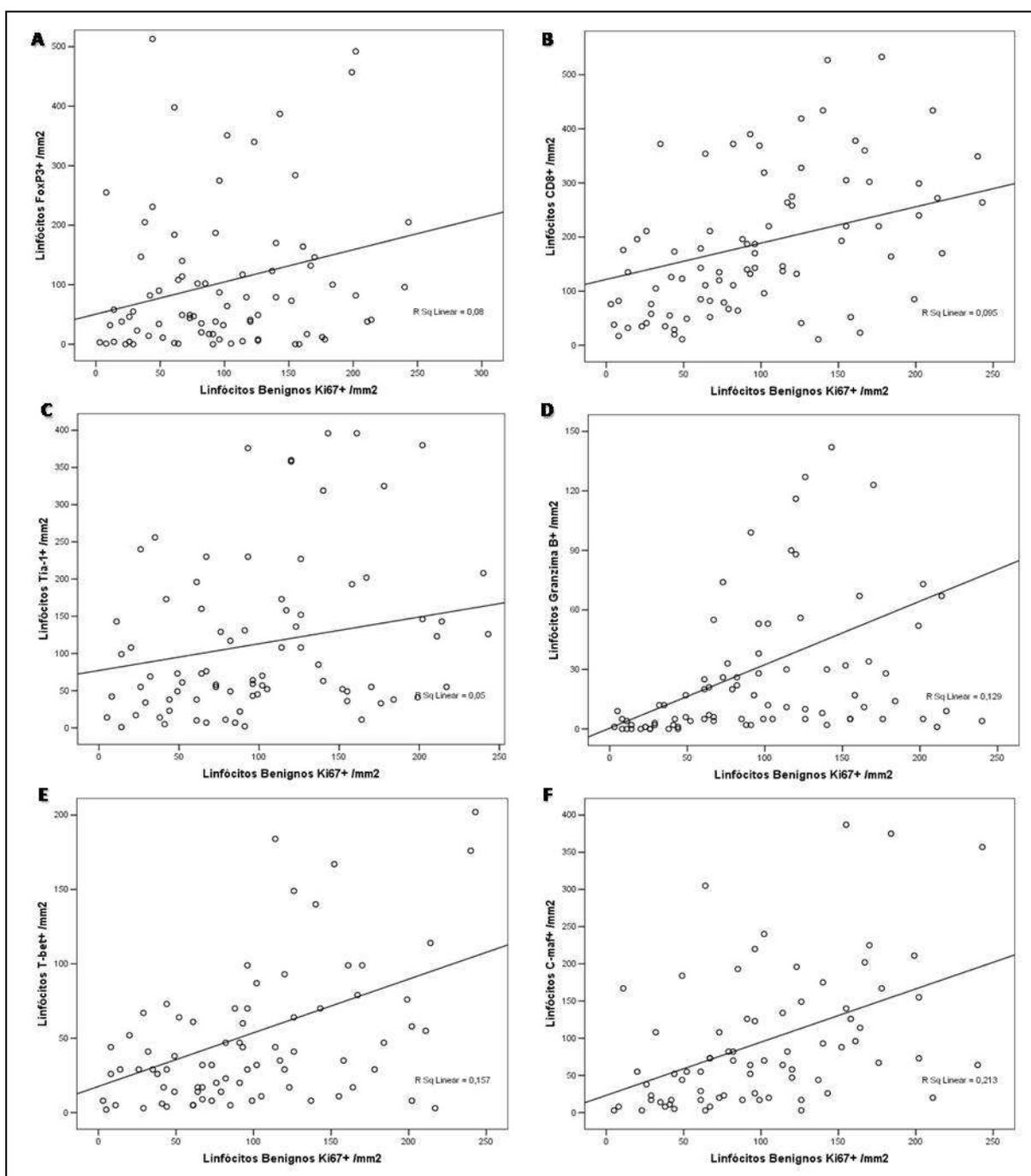


Figura 5.13: Gráficos de dispersão, mostrando as correlações diretas entre o número de linfócitos benignos Ki67+ e o número de linfócitos FoxP3+ (A), CD8+ (B), Tia-1+ (C), Granzima B+ (D), T-bet+ (E) e C-maf+ (F).

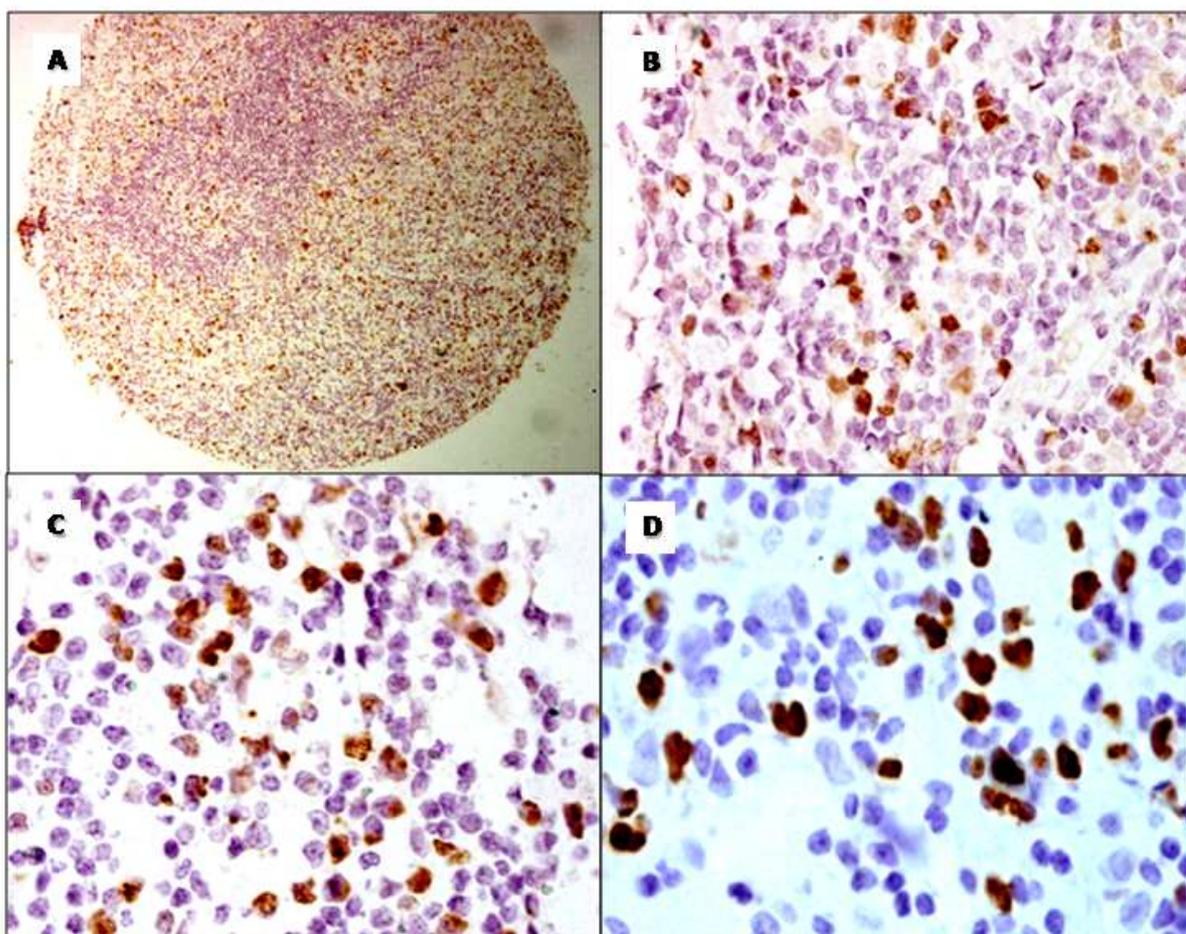


Figura 5.14: Linfócitos Ki67+. A) Exemplo de caso com grande número de linfócitos reacionais Ki67+. Apesar do pequeno aumento, é possível observar um grande número de marcações acastanhadas no core representado (Aumento original: 400x). B, C e D) Exemplos de casos com grande número de linfócitos reacionais Ki67+ (Aumento original: 400x).

### **5.3.2 As Populações Linfocitárias estão Associadas com Características Histológicas e Estatus do EBV no LHc Pediátrico**

Com a finalidade de melhor explorar as associações entre as características histológicas e as sub-populações linfocitárias, foram realizadas análises multivariadas.

O subtipo histológico CM foi caracterizado por um menor número de linfócitos T CD4+ /mm<sup>2</sup> (mediana CM 108 vs. 188,5 nos outros subtipos, p= 0,048; Teste de Mann-Whitney), maior número de linfócitos CD20+ /mm<sup>2</sup> (mediana CM 281 vs. 184 nos outros subtipos, p= 0,046) e razão entre linfócitos CD4+/CD20+ <1 (p= 0,004; teste exato de Fisher). Além disto, como mostrado anteriormente, a CM esteve associada ao EBV (p= 0,015, teste de Fisher). Na análise multivariada, a CM estava associada à presença do EBV (p= 0,045; IC95% 0,00 a 0,38) e à razão CD4/CD20 <1 (p= 0,014; IC95% -0,43 a -0,05) (Tabela 5.7).

O padrão interfolicular o qual esteve associado com o alto número de linfócitos CD8+, Tia-1+ e CD20+, manteve a associação independente com os linfócitos B (Tabela 5.7).

A EN GI esteve associada com o grande número de linfócitos T-bet+, CD8+, Tia-1+ e Granzima B+. Na análise multivariada, a associação foi mantida com o número de linfócitos T-bet+ e CD8+ (Tabela 5.7).

O granuloma esteve associado ao alto número de linfócitos T-bet+ e CD20+. A significância foi mantida com o número de linfócitos T-bet+ (p= 0,041; IC95% -0,004 até 0,00) (Tabela 5.7).

A presença do EBV esteve relacionada ao alto número de linfócitos T-bet+, CD8+, Tia-1+ e Granzima B+. A significância foi mantida com o número de linfócitos CD8+ (p= 0,015; IC95% -0,002 até 0,0) (Tabela 5.7).

As crianças com até 10 anos mostraram maior número de linfócitos T-bet+, CD8+ e Tia-1+. A significância foi mantida com o número de linfócitos CD8+ ( $p= 0,015$ , IC95% -0,001 até 0,00).

Tabela 5.7: Análise multivariada das características histológicas e virais associadas, na análise univariada, com o número de linfócitos do microambiente tumoral.

VARIÁVEIS	p	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
		Limite Inferior	Limite Superior
<b>Celularidade mista</b>			
EBV	0,045	0,0	0,3
Razão CD4/CD20 <1	0,014	-0,4	-0,5
<b>Padrão Interfolicular<sup>1</sup></b>			
Linfócitos CD8+ /mm <sup>2</sup>	0,5	-0,001	0,0
Linfócitos CD20+ /mm <sup>2</sup>	0,001	-0,001	0,0
<b>Grau da Esclerose Nodular<sup>2</sup></b>			
Linfócitos T-bet+ /mm <sup>2</sup>	0,006	-0,005	-0,001
Linfócitos CD8+ /mm <sup>2</sup>	0,01	-0,002	0,000
<b>Granuloma</b>			
Linfócitos T-bet+ /mm <sup>2</sup>	0,041	-0,004	0,0
Linfócitos CD20+ /mm <sup>2</sup>	0,2	-0,001	0,0
<b>Associação com o EBV<sup>3</sup></b>			
Linfócitos T-bet+ /mm <sup>2</sup>	0,1	-0,003	0,0
Linfócitos CD8+ /mm <sup>2</sup>	0,015	-0,002	0,0
<b>≤10 anos<sup>3</sup></b>			
Linfócitos T-bet+ /mm <sup>2</sup>	0,1	-0,003	0,0
Linfócitos CD8+ /mm <sup>2</sup>	0,015	-0,001	0,0

<sup>1</sup>O número de linfócitos CD3+, Tia-1+ e Granzima B+ foi retirado da equação para evitar redundância.

Todos os linfócitos nesta equação são CD3+. Os linfócitos comprometidos com a citotoxicidade (Tia-1+ e Granzima B+) são CD8+. <sup>2</sup> O número de linfócitos Tia-1+ foi retirado da equação para evitar redundância, já que os linfócitos Tia-1+ são também CD8+. <sup>3</sup>O número de linfócitos Tia-1+ e Granzima B+ foi retirado da equação para evitar redundância. Os linfócitos comprometidos com a citotoxicidade (Tia-1+ e Granzima B+) são CD8+.

### **5.3.3 As Características do Microambiente Tumoral Estão Associadas ao Prognóstico no Linfoma de Hodgkin Clássico da Infância**

As características clínicas associadas a pior SLE nesta população foram doença extranodal ( $p= 0,028$ ; Teste Log-rank) e leucopenia ( $p= 0,034$ ). O LHC associado ao EBV mostrou tendência de melhor SLE ( $p= 0,082$ ) (Figura 5.15) (Tabela 5.8). Em relação ao microambiente tumoral, pior SLE foi observada nos casos com granuloma ( $p= 0,026$ ), linfócitos CD3+ menor que o percentil 25 ( $p= 0,037$ ) e linfócitos Granzima B+ maior que o percentil 25 ( $p= 0,045$ ). Uma tendência à pior SLE foi observada nos pacientes com o subtipo histológico celularidade mista ( $p= 0,057$ ), linfócitos Tia-1+ superior ao percentil 25 ( $p= 0,08$ ) e linfócitos em estado proliferativo (Ki67+) superior ao percentil 25 ( $p= 0,093$ ) (Figura 5.16). O balanço entre as populações linfocitárias não mostrou diferenças na SLE (Tabela 5.8).

Na regressão de Cox, considerando as variáveis estatisticamente significantes, a doença extranodal ( $p= 0,016$ ; IC95% 0,08 até 0,7) e a presença de linfócitos Granzima B+ maior que o percentil 25 mantiveram o impacto prognóstico independente (Tabela 5.9) A tabela A5 (Anexo V) mostra todas as variáveis analisadas na regressão de Cox.

Tabela 5.8: Sumário das características clínicas, histológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr ao diagnóstico e a sobrevida livre de eventos nos casos de linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	CASOS ANALISÁVEIS PARA SLE (%)	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)
<b>Número de Sítios</b>			
Mediana (Variação)	3 (1-9)		
< 4	55/90 (61)	83,6	
≥ 4	35/90 (39)	68,6	0,071
<b>Doença Extranodal</b>			
Sim	11/90 (12,3)	54,5	
Não	79/90 (87,7)	81,0	0,028
<b>Leucopenia</b>			
Sim	10/90 (11,2)	50	
Não	80/90 (88,8)	80	0,034
<b>Subtipo Histológico</b>			
Esclerose nodular	66/91 (72,5)	78,8	
Celularidade mista	18/91 (19,7)	61,1	
Depleção linfocitária	1/91 (1,4)	NA	
Rico em linfócitos	2/91 (2,1)	NA	
Inclassificável	4/91 (4,3)	NA	0,057 <sup>1</sup>
<b>Associação com EBV</b>			
Sim	36/88 (36,4)	86,1	
Não	52/88 (63,6)	69,2	0,082
<b>Linfócitos CD3+</b>			
≤451/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	22/83 (26,5)	60,0	
>451/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	61/83 (73,5)	80,4	0,037

Tabela 5.8 (continuação): Sumário das características clínicas, histológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr virus ao diagnóstico e a sobrevida livre de eventos nos casos de linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	CASOS ANALISÁVEIS	SLE (%)	ANÁLISE
	PARA SLE (%)		UNIVARIADA (P)
<b>Linfócitos Tia-1+</b>			
≤39/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	20/81 (24,7)	89,5	
>39/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	61/81 (75,3)	69,1	0,08
<b>Linfócitos Granzima B+</b>			
≤4/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	22/78 (28,3)	90,6	
>4/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	56/78 (71,7)	69,6	0,045
<b>Linfócitos Benignos Ki67+</b>			
≤44/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	22/85 (25,9)	86,4	
>44/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	63/85 (74,1)	69,6	0,093

<sup>1</sup>Apenas os subtipos esclerose nodular e celularidade mista foram incluídos na equação, os demais foram excluídos devido ao pequeno número de casos. SLE: sobrevida livre de eventos. VSH: velocidade de eritrossedimentação. Célula H-RS: célula de Hodgkin e Reed-Sternberg. EBV: vírus Epstein-Barr.

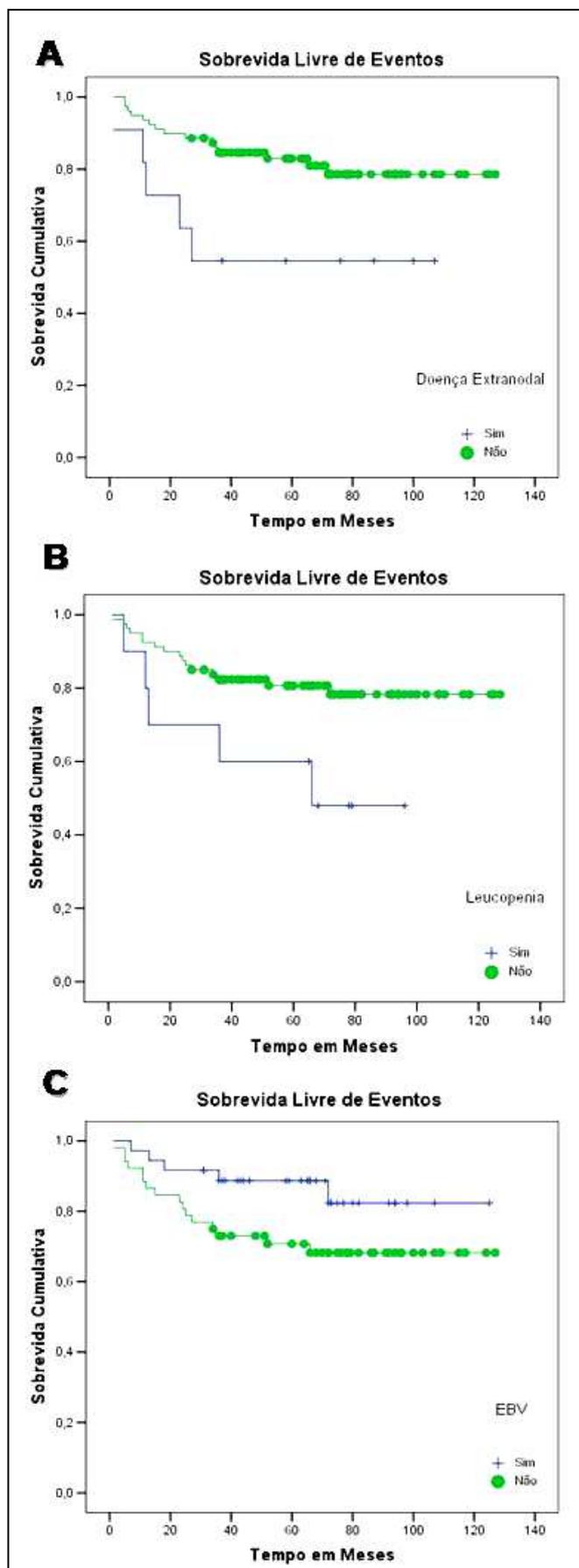


Figura 5.15: Sobrevida livre de eventos no linfoma de Hodgkin clássico em relação à presença da doença extranodal (A) ( $p= 0,028$ ; Log-rank); leucopenia (B) ( $p= 0,034$ ; Log-rank) e o estatus de associação com o vírus Epstein-Barr (C) ( $p= 0,082$ ; Log-rank).

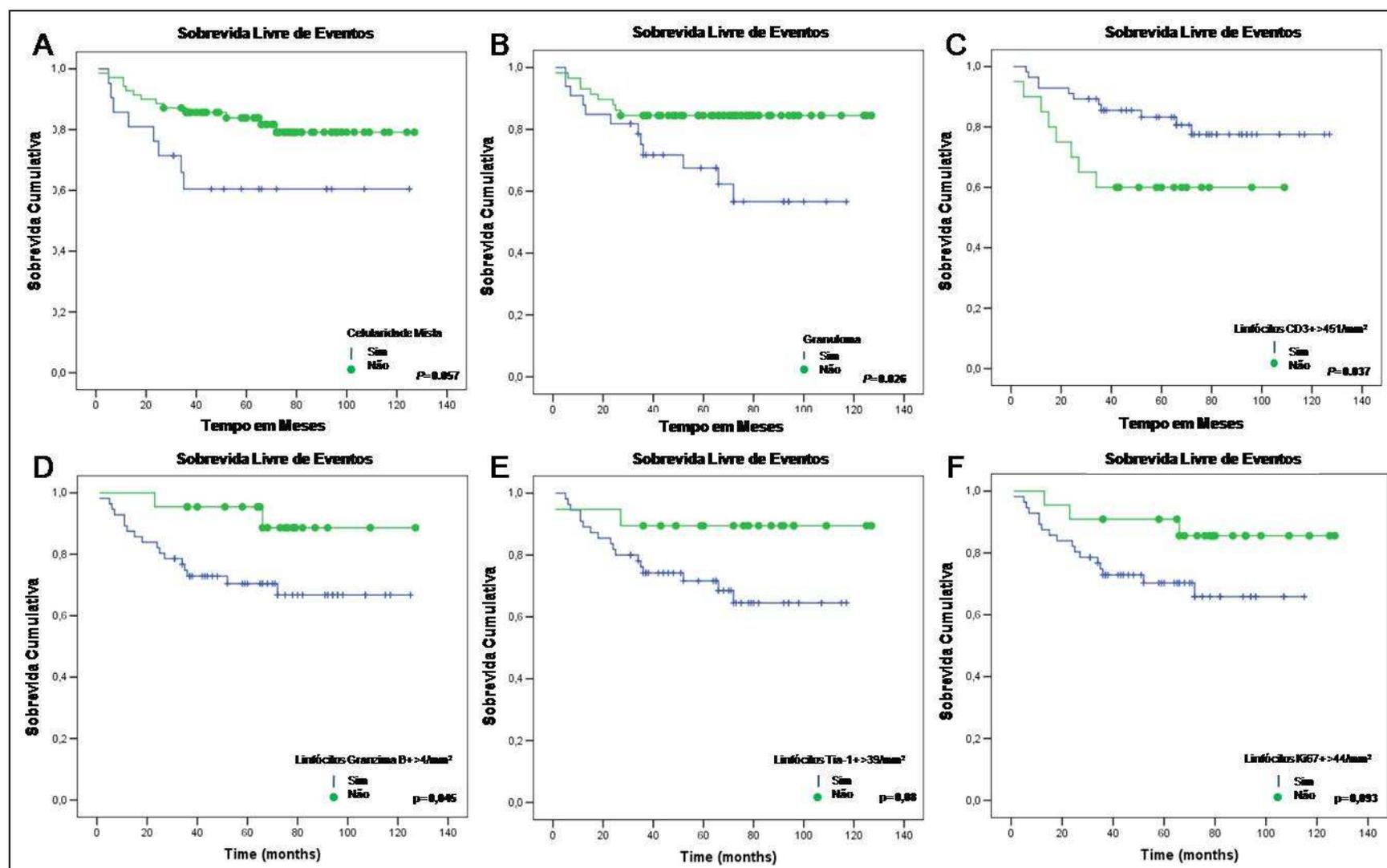


Figura 5.16: Sobrevida livre de eventos das variáveis histológicas e imunofenotípicas associadas a características histológicas e imunológicas do microambiente tumoral no LHC pediátrico.

Tabela 5.9: Regressão de Cox das variáveis clínicas, histológicas e imunohistoquímicas associadas estatisticamente à sobrevida livre de eventos.

VARIÁVEIS	p	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
		Limite Inferior	Limite Superior
Doença Extranodal	0,016	0,08	0,7
Leucopenia	0,3	0,1	2,0
Presença de Granuloma	0,1	0,1	1,1
Linfócitos CD3+ maior que 451/mm <sup>2</sup>	0,1	0,8	6,7
Linfócitos Granzima B+ maior que 4/mm <sup>2</sup>	0,04	0,04	0,9

### 5.3.4 Escore Prognóstico Baseado nas Características Clínicas e do Hospedeiro

Um escore prognóstico foi construído, baseado nas variáveis com  $p < 0,05$  na regressão de Cox, descritas na Tabela 5.9. Os casos com doença extranodal e linfócitos Granzima B+ superior ao nível padrão receberam 1 ponto, na presença de cada uma das variáveis ou 0 na ausência de cada uma das variáveis. Desta forma, 3 grupos foram evidenciados: o primeiro grupo com 0 ponto e possuidor de uma excelente SLE, o segundo grupo com apenas 1 ponto e mostrando uma sobrevida intermediária, e o último grupo com 2 pontos e exibindo uma pior SLE ( $p = 0,005$ , Log-rank) (Tabela 5.10 e Figura 5.17).

Tabela 5.10: Descrição do número de eventos na sobrevida livre de eventos (SLE) de acordo com o escore prognóstico proposto.

ESCORE	EVENTOS	SLE (%)
0	1/17	94,1
1	12/50	76,0
2	4/7	42,9

P= 0,005 (Log-rank)

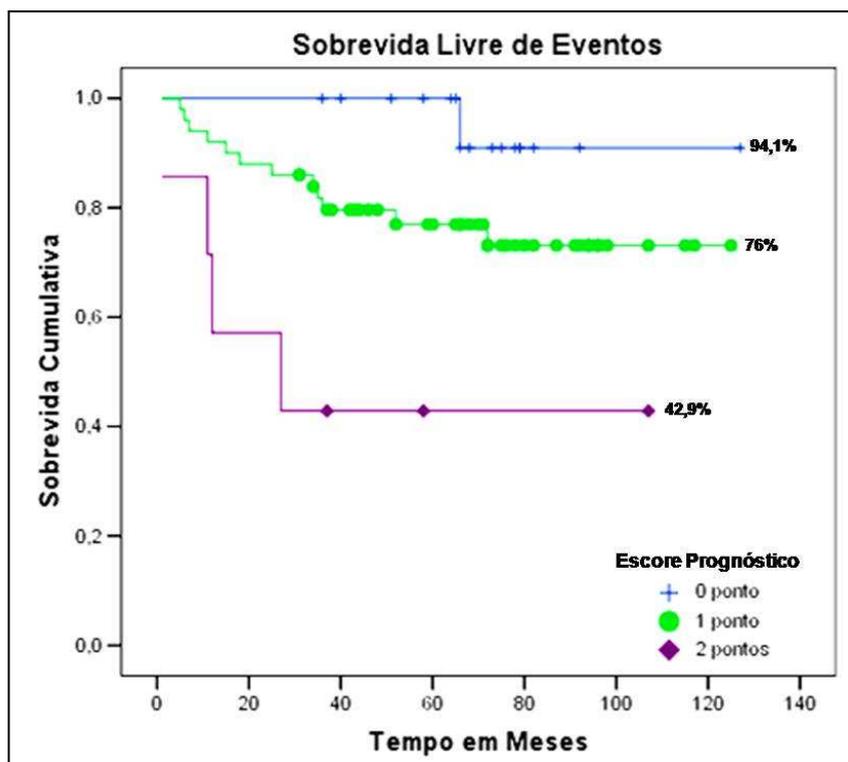


Figura 5.17: Sobrevida livre de eventos do linfoma de Hodgkin clássico com a utilização de escore prognóstico combinando a presença de doença extranodal com número de células Granzima B+ ( $p=0,005$ ; Log-rank).

### 5.3.5 O Vírus Epstein-Barr Influencia o Papel Prognóstico do Microambiente Tumoral

Visto a associação de algumas características do microambiente tumoral com o EBV, assim como a tendência observada sobre o impacto positivo da presença deste vírus na SLE, foi levantada a hipótese de que a presença do EBV seria capaz de modular o papel prognóstico do microambiente tumoral no LHc pediátrico. Para isto, foi realizada uma nova análise de associação estratificando-se os casos quanto ao estatus do EBV.

Nos casos EBV negativos, uma pior SLE foi observada nos pacientes com CM ( $p=0,009$ , teste Log-rank), linfócitos Tia-1+ superior ao nível padrão ( $p=0,044$ ) e linfócitos Granzima B+ superior ao nível padrão ( $p=0,04$ ). Embora a doença

extranodal não seja uma variável do microambiente, é importante mencionar que as crianças com esta característica só tiveram pior SLE quando não foram associadas ao EBV ( $p= 0,028$ ) (Tabela 5.11). Na regressão de Cox, todas as variáveis mantiveram o impacto prognóstico na SLE (Tabela 5.12).

Já nos casos associados ao EBV, uma pior SLE foi encontrada nas crianças com granuloma ( $p= 0,035$ ; Teste Log-rank), alto nível de linfócitos FoxP3+ ( $p= 0,046$ ), razão entre os linfócitos FoxP3+/CD8+  $>1$  ( $p= 0,021$ ) e T-bet+/C-maf+  $>1$  ( $p= 0,017$ ) (Tabela 5.11). Por conta do pequeno número de casos neste grupo, a regressão de Cox não pode ser realizada.

Tabela 5.11: Associação diferencial de características histopatológicas e composição do microambiente tumoral com a sobrevida livre de eventos (SLE), de acordo ao estatus de associação com o vírus Epstein-Barr.

VARIÁVEL	EBV +			EBV -		
	EVENTOS	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)	EVENTOS	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)
<b>Celularidade Mista</b>						
Sim	2/10	80	0,4	5/7	28,6	0,009
Não	3/26	88,5		11/45	75,6	
<b>Linfócitos CD3+/mm<sup>2</sup></b>						
< 451 (percentile 25)	1/5	80,0	0,42	7/14	50	0,07
> 451 (percentile 25)	3/25	88,0		8/31	74,2	
<b>Linfócitos FoxP3 /mm<sup>2</sup></b>						
≤ 49 (percentil 50)	14/0	100	0,046	10/28	64,3	0,46
> 49 (percentil 50)	4/15	73,3		5/20	75,0	
<b>Linfócitos Tia-1+ /mm<sup>2</sup></b>						
≤ 39 (percentil 25)	0/3	100	0,48	2/15	86,7	0,044
> 39 (percentil 25)	4/26	84,6		13/29	55,2	
<b>Linfócitos Granzyme B+ /mm<sup>2</sup></b>						
≤ 4 (percentil 25)	0/5	100	0,34	2/16	87,5	0,040
> 4 (percentil 25)	4/25	84		13/31	58,1	
<b>Razão FoxP3/CD8 &gt;1</b>						
Sim	1/2	50	0,021	5/16	68,8	0,92
Não	3/27	88,9		10/32	68,8	
<b>Razão FoxP3/Tia-1 &gt;1</b>						
Sim	2/6	66,7	0,06	4/20	80,0	0,12
Não	2/22	90,0		11/26	57,7	

Tabela 5.11 (continuação): Associação diferencial de características histopatológicas e composição do microambiente tumoral com a sobrevida livre de eventos (SLE), de acordo ao estatus de associação com o vírus Epstein-Barr.

VARIÁVEL	EBV +			EBV -		
	EVENTOS	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)	EVENTOS	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)
<b>Razão CD4/CD20 &gt; 1</b>						
Sim	0/11	100	0,08	5/20	75,0	0,30
Não	5/18	72,2		10/24	58,3	
<b>Razão T-bet/C-maf &gt;1</b>						
Sim	4/12	66,7	0,017	2/10	80,0	0,32
Não	0/16	100		12/31	61,3	
<b>Linfócitos Ki67+ /mm<sup>2</sup></b>						
≤ 44 (percentil 25)	1/8	87,5	0,59	2/13	84,6	0,10
> 44 (percentil 25)	4/23	82,6		13/33	60,6	

Tabela 5.12: Regressão de Cox das variáveis estatisticamente significantes na sobrevida livre de eventos do linfoma de Hodgkin clássico não associado ao vírus Epstein-Barr.

VARIÁVEIS	p	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
		Limite Inferior	Limite Superior
Doença Extranodal	0,002	0,03	0,4
Celularidade Mista	0,005	0,05	0,5
Linfócitos Granzima B+ maior que 4/mm <sup>2</sup>	0,024	0,03	0,7

Nota: O número de linfócitos Tia-1+ não foi incluído na equação por estar correlacionado ao número de linfócitos Granzima B+ ( $p < 0,0005$ , correlação de Spearman). O número de linfócitos Granzima B+ foi escolhido para ser utilizado na equação, ao invés do número de linfócitos Tia-1+, já que a imunexpressão de Granzima B só ocorrer nos linfócitos T citotóxicos ativados, ao contrário da imunexpressão de Tia-1 que independe do estado de ativação<sup>183</sup>.

#### 5.4 O Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin Clássico está Associado a Características de Funcionalidade do Ciclo Celular e Apoptose das Células Neoplásicas

Nesta parte do trabalho, analisamos algumas características do ciclo celular e apoptose das células H-RS, em relação à expressão de proteínas-chave

(p53, p21, Bcl2), assim como através de marcadores de cinética populacional, como o índice de proliferação celular (IPC, medido através da semiquantificação da expressão de Ki67), o número de células H-RS, o número de mitoses e finalmente, o número de células uni e multinucleadas (NUN e NMN, respectivamente) (Figura 5.18). O objetivo foi explorar uma possível interação (“cross-talk”) entre as células H-RS e as populações linfocitárias no microambiente tumoral.

Oitenta e nove dos 100 casos foram avaliáveis quanto à imunoexpressão de p53, sendo 36 (40,4%) pacientes considerados positivos (>50% de células H-RS imunomarcadas para p53), indicando o acúmulo desta proteína.

Já 83 dos 100 casos foram avaliáveis para o p21. Quarenta e três pacientes (51,8%) foram considerados positivos para esta proteína (>50% de células H-RS imunomarcadas para p21).

A análise combinada de p53/p21 mostrou:

33 (40,2%) casos p53-/p21-;

30 (36,5%) casos p53+/p21+;

13 (15,8%) casos p53-/p21+;

6 (7,5%) casos p53+/p21-.

Conforme descrito na metodologia, a via de p53 foi considerada funcional em 43 dos 83 casos analisáveis (51,8%). Todos os casos p53+/p21- mostraram acúmulo de p53 em mais de 75% das células H-RS (Figura 5.18).

Um alto índice de proliferação células (>50% das células H-RS imunomarcadas para Ki67) foi observado em 53 dos 96 casos analisáveis (55,2%).

A imunoexpressão de Bcl2 foi avaliada em 82 casos. Quarenta e três casos (52,4%) foram considerados Bcl2-positivos (Bcl2 em mais de 10% das células H-RS).

A positividade de Bcl2, p21, p53, a funcionalidade da via de p53 e um alto IPC não tiveram influências na SLE (Tabela A6, Anexo 5).

Células H-RS com alto IPC (Ki67>50%) foram freqüentemente observadas, porém sem estarem associadas ao número de células neoplásicas em 10CGA, número de células neoplásicas em mitose em 10CGA ou número de células uni/multinucleadas /mm<sup>2</sup>, independentemente da utilização de 50% (alto IPC) ou 75% (extremamente alto IPC) como ponto de corte.

Um elevado número de células neoplásicas em mitose foi observado nos casos p21+ (p< 0,0005; teste de Mann-Whitney) e com a via de p53 funcional (p< 0,0005) (Figura 5.19). O mesmo foi observado quando pontos de corte foram empregados: 8/9 (88,9%) casos com >10 mitoses /10CGA eram p21+ e tinham a via de p53 funcional (p= 0,03; teste de Fisher). Curiosamente, dos 14 casos com mais células NMN do que células NUN (NMN/NUN >1), 10 (71,4%) foram associados com a positividade de p21 (14/17 casos avaliáveis para p21).

Não foi observada qualquer associação estatística entre a expressão de p21 nas células H-RS e o estatus de associação com o EBV, nem quanto o nível de expressão foi analisado (p= 0,4), nem quando diferentes pontos de corte foram utilizados (p21 > 10%, p= 0,4; e p21 >50%, p= 0,6.  $\chi^2$ ).

Um maior número de células NMN em relação às célula NUN (NMN/NUN >1) foi observado nos casos com p53-funcional (p= 0,038; teste de Fisher).

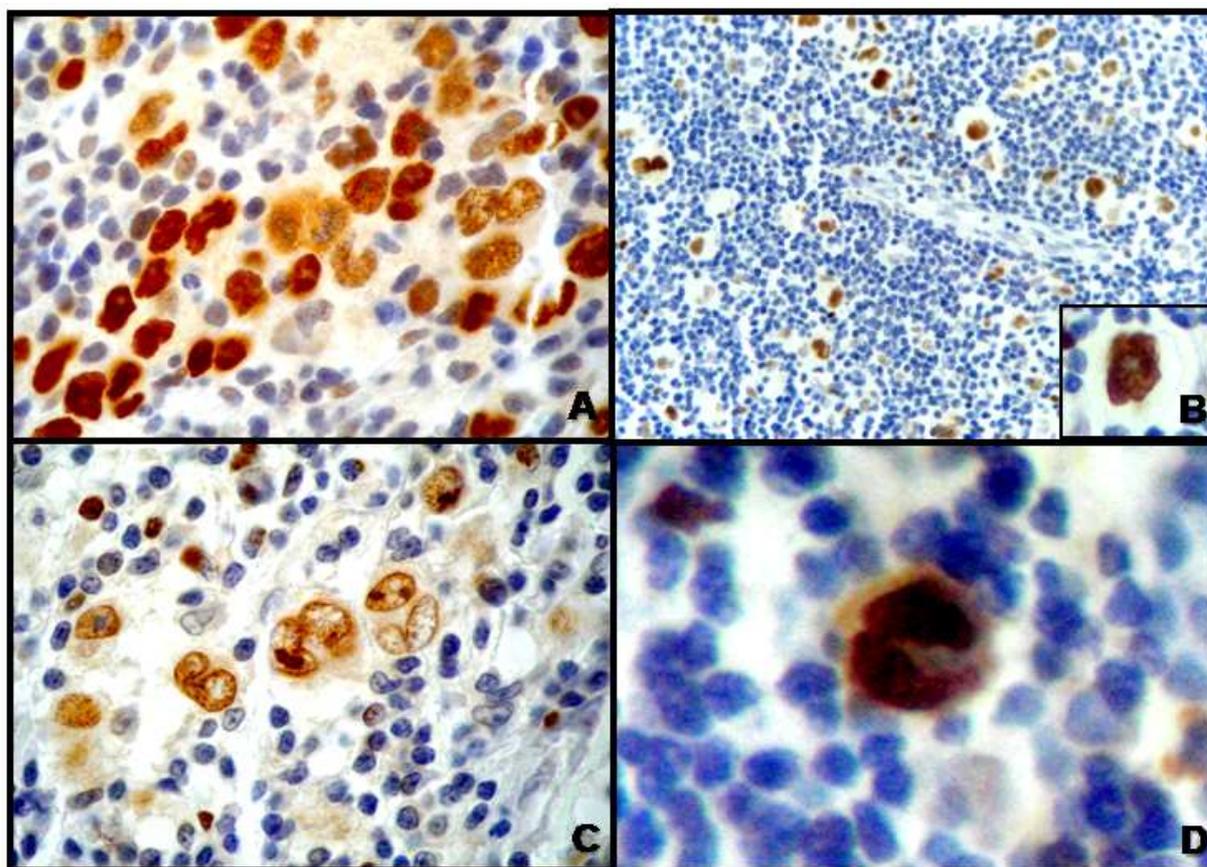


Figura 5.18: Análise do ciclo celular mediante avaliação de expressão protéica por IHQ. A) Células neoplásicas com expressão de p53, mostrando marcação nuclear típica (1000x). A positividade para este anticorpo é devida ao acúmulo da proteína p53 no núcleo das células. B) Células neoplásicas (100x), e em detalhe célula de Reed-Sternberg (1000x), positivas para p21, exibindo marcação nuclear característica. C e D) Células neoplásicas positivas para Ki67, mostrando marcação nuclear típica (1000x).

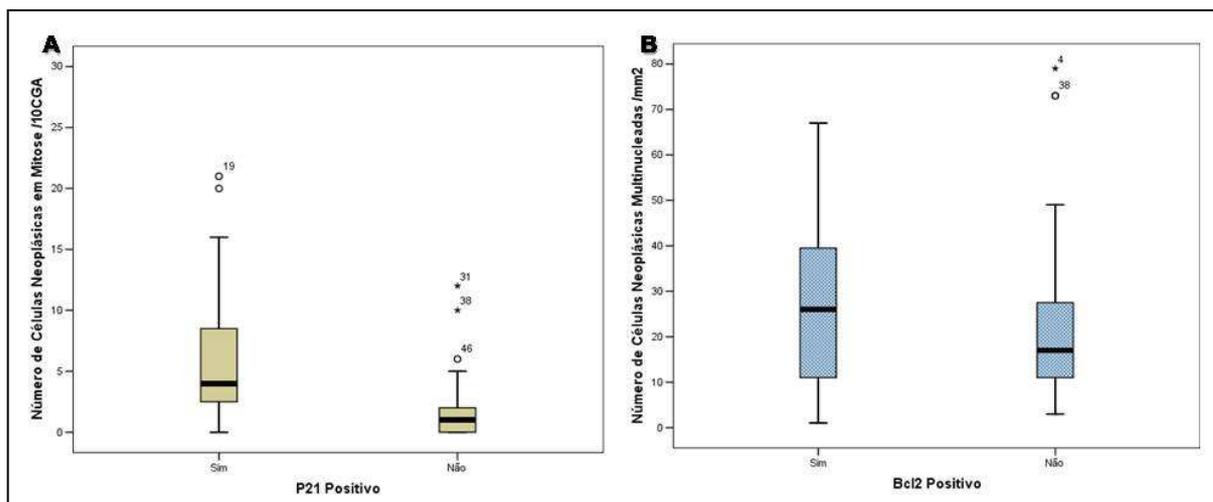


Figura 5.19: A) Distribuição do número de células neoplásicas em mitose por 10 campos de grande aumento (CGA) em relação a positividade de p21. B) Distribuição do número de células neoplásicas multinucleadas por mm<sup>2</sup> em relação à positividade de Bcl2.

#### 5.4.1 Relação entre o Número de Linfócitos do Microambiente

##### Tumoral e as Células Neoplásicas

Um elevado número de linfócitos FoxP3+/mm<sup>2</sup> foi observado nos casos p21+ (p= 0,002; teste de Mann-Whitney), com a via de p53 funcional (p= 0,005) e nos casos Bcl2+ (p= 0,01) (Figura 5.20).

Grande número de linfócitos T-bet+/mm<sup>2</sup> foi observado nas crianças com mais células NUN do que NMN (p= 0,046; Teste de Mann-Whitney), p21+ (p= 0,039) e com alto IPC (p= 0,037) (Figura 5.20).

Elevado número de linfócitos CD8+/mm<sup>2</sup> foi associado aos casos com alto IPC (p= 0,039; teste de Mann-Whitney). Já um maior número de linfócitos Granzima B+ foi observado nos casos com mais células NUN do que NMN (NMN/NUN <1) (p= 0,015) e Bcl2+ (p= 0,001) (Figura 5.20).

Os casos com mais células NMN em relação às células NUN (NMN/NUN >1) estiveram associados a baixo nível de linfócitos Granzima B+ (percentil 50 como

ponto de corte) ( $p= 0,027$ ; teste de Fisher) e a razão entre linfócitos CD4+/CD20+ >1 ( $p= 0,043$ ) (Tabela 5.13).

Tabela 5.13: Associação do balanço do número de células neoplásicas uninucleadas (NUN) e multinucleadas (NMN) com o nível de linfócitos Granzima B+ e o balanço entre o número de linfócitos CD4+/CD20+.

VARIÁVEIS	NUN/NMN >1		p
	Sim (%)	Não (%)	
<b>Linfócitos Granzima B+</b>			
≥11 /mm <sup>2</sup>	37 (53,6)	2 (16,7)	0,018
<11 /mm <sup>2</sup>	32 (46,4)	10 (83,3)	
Total	69 (100)	12 (100)	
<b>Razão Linfócitos CD4+/CD20+ &gt;1</b>			
Sim	30 (44,8)	1 (10)	0,043
Não	37 (55,2)	9 (90)	
Total	67	10	

A análise por agrupamentos hierárquico identificou 2 grupos principais (Figura 5.21). O Grupo I foi composto pela funcionalidade de p53, maior número de células NMN em relação às células NUN, associação com o EBV, alto número de linfócitos CD4+, T-bet+, CD8+, Tia-1+ e CD20+. Já o Grupo II incluiu os casos EBV-, com elevado número de células NUN em relação às células NMN, via de p53 disfuncional, Bcl2+, alto IPC, grande número de células H-RS e grande número de células Th2.

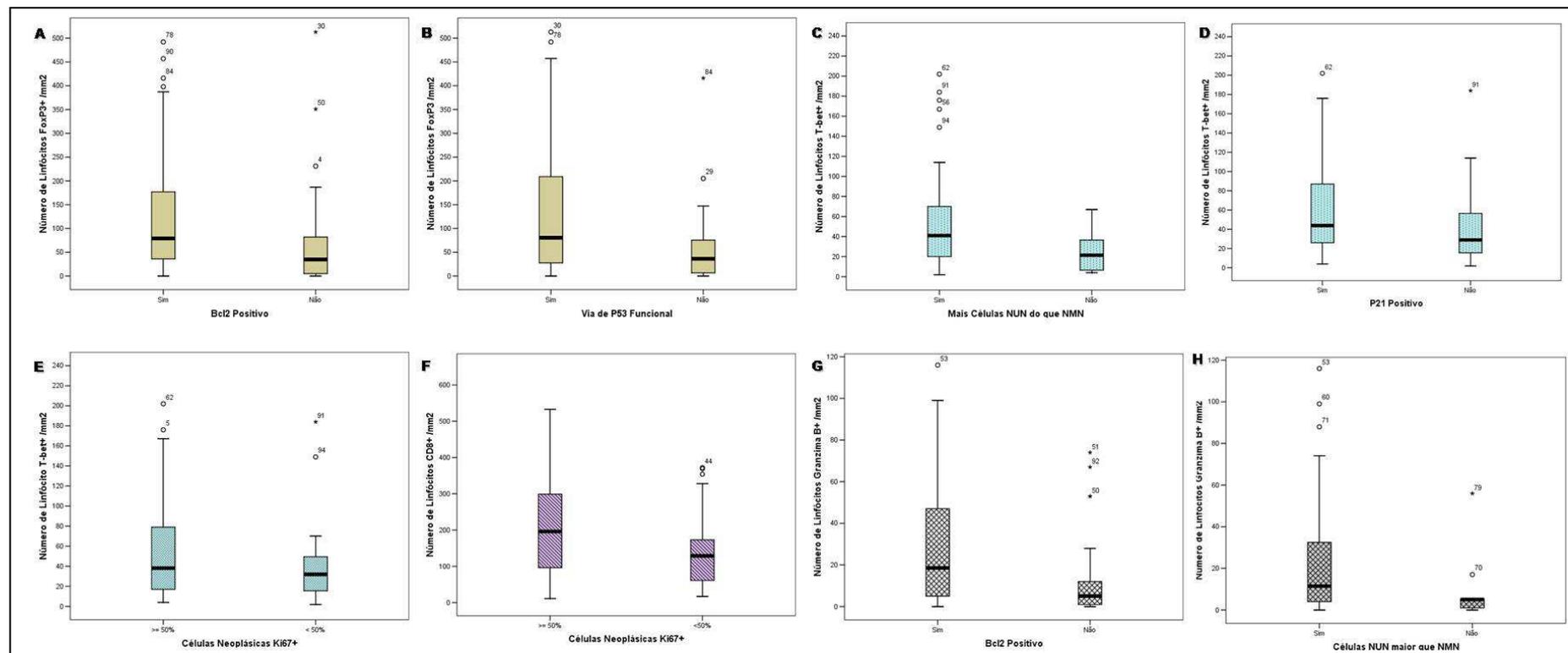


Figura 5.20: Gráficos do tipo “Box plot” mostrando associações do “cross-talk” entre células neoplásicas e microambiente tumoral. A) Distribuição do número de linfócitos FoxP3+ em relação à expressão de Bcl2 (>10%) nas células H-RS. B) Distribuição do número de linfócitos FoxP3+ quanto a funcionalidade da via de p53. C) Distribuição do número de linfócitos T-bet+ quanto ao balanço entre o número de células neoplásicas uninucleadas (NUN) e multinucleadas (NMN). D) Distribuição do número de linfócitos T-bet+ quanto a expressão de p21 (>50%) pelas células H-RS. E) Distribuição do número de linfócitos T-bet+ quanto ao índice de proliferação celular (IPC) das células neoplásicas (Ki67>50%). F) Distribuição do número de linfócitos CD8+ quanto ao IPC das células neoplásicas (Ki67>50%). G) Distribuição do número de linfócitos Granzima B+ quanto a expressão de Bcl2 (>10%) nas células H-RS. H) Distribuição do número de linfócitos Granzima B+ quanto ao balanço entre o número de células NUN/NMN.

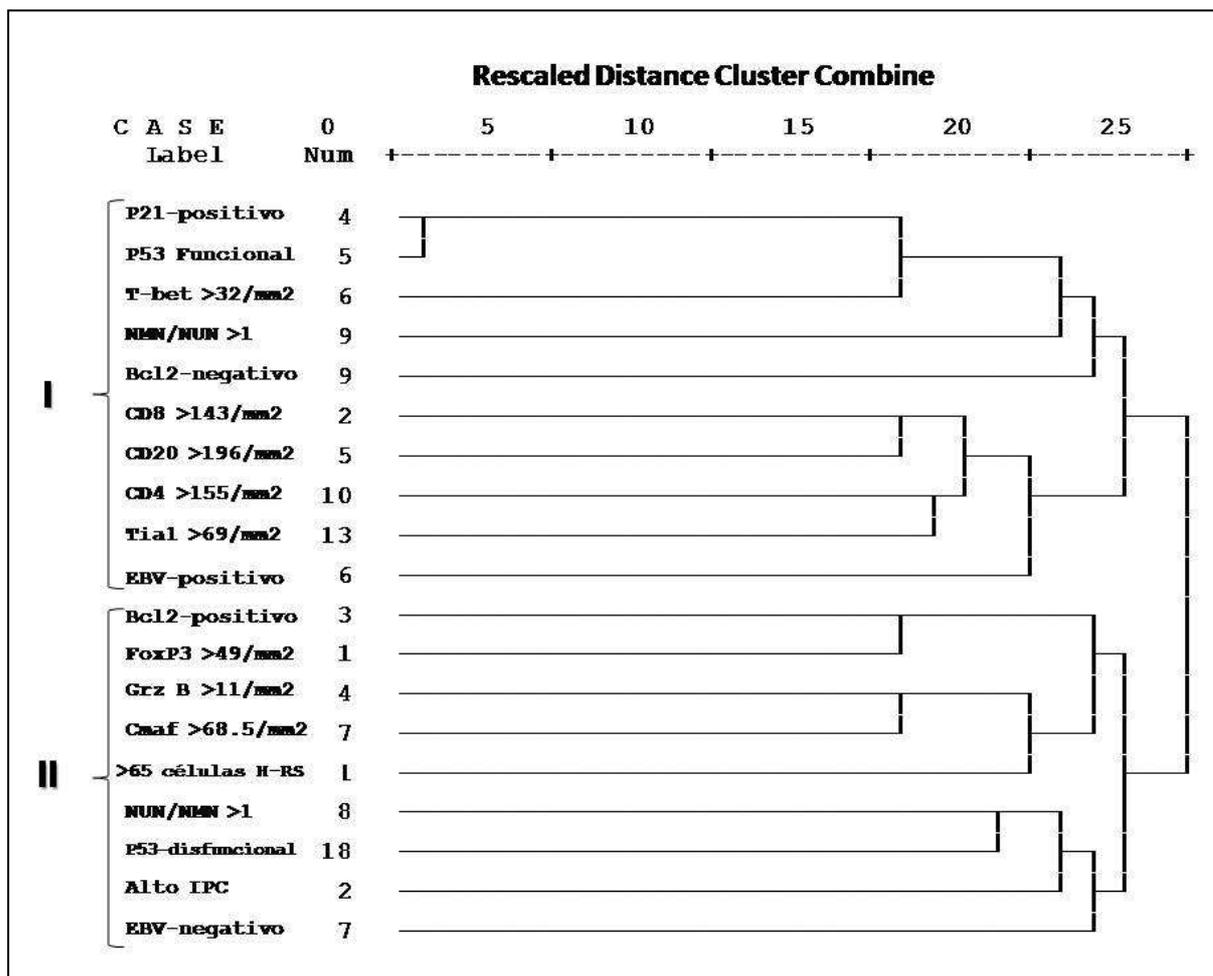


Figura 5.21: Dendrograma obtido por agrupamento hierárquico das variáveis obtidas das células neoplásicas e do microambiente tumoral dos casos de LHC pediátricos analisados. Os grupos principais são identificados por chaves. I) P21-positivo: células neoplásicas p21+ (>50%); P53 funcional: células neoplásicas exibindo a via de p53 funcional; T-bet: linfócitos T-bet+; NMN/NUM >1: balanço entre células neoplásicas multinucleadas e uninucleadas >1; Bcl2-negativo: células neoplásicas Bcl2-; CD8: linfócitos CD8+; CD20: linfócitos CD20+; CD4: linfócitos CD4+; Tia1: linfócitos Tia-1+; EBV-positivo: casos associados ao vírus Epstein-Barr. II) Bcl2-positivo: células neoplásicas Bcl2+; FoxP3: linfócitos FoxP3+. GrzB: linfócitos Granzima B+; Cmaf: linfócitos C-maf+; >65 células H-RS: >65 células neoplásicas em 10 campos de grande aumento; NUM/NMN >1: balanço entre células neoplásicas uninucleadas e multinucleadas >1; p53-disfuncional: células neoplásicas exibindo via de p53 disfuncional; Alto IPC: alto índice de proliferação celular; EBV-negativo: casos não associados ao EBV.

#### 5.4.2 Análises Multivariadas

O número de células H-RS em mitose manteve a associação estatística com a funcionalidade da via de p53 ( $p= 0,02$ ; IC95% 0,02 a 0,3) e número de linfócitos Tia-1+ ( $p= 0,016$ , IC95% -0,3 a -0,03).

O balanço entre as células NUN e NMN  $>1$  (mais células NUN do que NMN) esteve associado independentemente à disfuncionalidade da via de p53 ( $p= 0,036$ ; IC95% -0,36 a -0,12) e limitrofemente ao número de linfócitos Granzima B+ ( $p= 0,081$ ; IC95% -0,018 a 0,29).

Para identificar um possível “cross-talk” entre as células H-RS e os linfócitos do microambiente tumoral, foram realizadas regressões logísticas, conforme mostrado na tabela 5.14. Neste modelo, o fenótipo antiapoptótico esteve associado a um maior número de células Tregs e citotóxicas; a expressão de p21 ( $>50\%$ ) esteve associada a um maior número de células Tregs e Th1 e o alto IPC das células neoplásicas esteve associado ao maior número de linfócitos T CD8+.

Tabela 5.14: Análise multivariada entre as variáveis referentes às células neoplásicas e as variáveis referentes ao microambiente tumoral.

VARIÁVEL DEPENDENTE	MODELO	P	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
			INFERIOR	SUPERIOR
NMN/NUN >1	T-bet >percentil 50	0,2	-0,05	0,25
	Granzima B >percentil 50	0,033	0,01	0,3
Bcl2-positividade	FoxP3	0,03	0,1	0,5
	Granzima B	0,03	0,1	0,5
P21-positividade	FoxP3> percentil 50	0,004	0,1	0,5
	T-bet > percentil 50	0,037	0,01	0,4
Alto IPC	T-bet > percentil 50	0,9	-2,2	0,2
	CD8> percentile 50	0,02	0,03	0,4

NMN/NUN >1: balanço entre as células neoplásicas multinucleadas e uninucleadas >1, indicando que há mais células neoplásicas multinucleadas do que uninucleadas; T-bet: linfócitos T-bet+; Granzima B: linfócitos Granzima B+; Bcl2-positividade: caso positivo para Bcl2, indicando que mais de 10% das células neoplásicas são Bcl2+; FoxP3: linfócitos FoxP3+; p21-positividade: caso positivo para p21, indicando que mais de 10% das células neoplásicas são p21+; Alto IPC: alto índice de proliferação celular, indicando que mais de 50% das células neoplásicas são Ki67+; CD8: linfócitos CD8+.

## 5.5 Contribuições do Polimorfismo da Região Promotora da IL10 para a Biologia do LHC Pediátrico

Para esta parte do estudo, foram estudados somente 78 dos 100 casos de LHC pediátricos previamente descritos. Isto foi devido à falta de amplificabilidade do DNA obtido do material de arquivo, ou material escasso para estudos moleculares no restante dos 22 casos.

### 5.5.1 Caracterização dos Polimorfismos

As freqüências genótípicas e alélicas das posições -1082, e -592, assim como dos haplótipos do promotor proximal encontradas nos pacientes com LHC estão descritas na tabela 5.15. Uma análise das freqüências dos polimorfismos

citados acima mostrou que a população de pacientes encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg tanto na posição -1082G/A ( $p= 0,23$ ;  $\chi^2$ ) quanto na posição -592A/C ( $p= 0,45$ ,  $\chi^2$ ).

A combinação entre os genótipos dos SNPs em haplótipos foi confirmada experimentalmente através de 3 PCRs alelo específicas por caso. Os haplótipos ACC, ATA e GCC foram detectados em homozigose e heterozigose (figura 5.22 e 5.23).

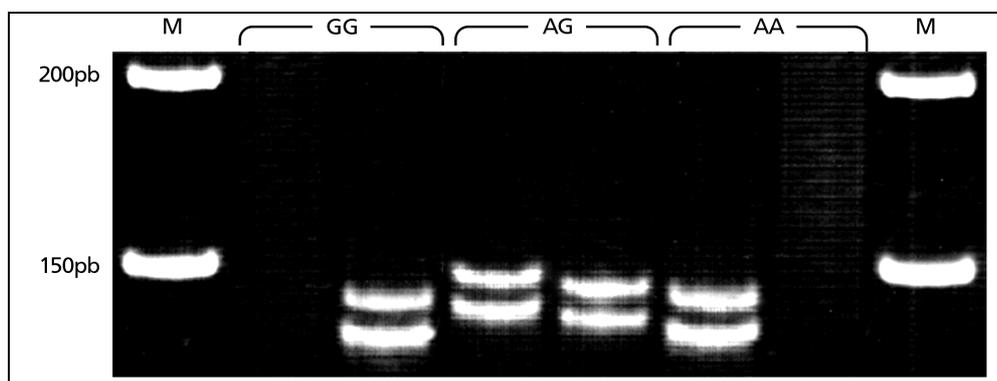


Figura 5.22: Detecção dos genótipos da posição -1082 da IL-10 em homo e heterozigose, por AS-PCRs. Gel de poliacrilamida 0,8% corado com nitrato de prata. M: Marcador de peso molecular 200 e 150pb. Para cada posição (GG, AG ou AA), o 1º poço representa o produto da reação de PCR para a guanina da posição -1082 e o 2º poço a adenina da posição -1082. As duas bandas em GG representam um caso homozigoto para o alelo G, sendo então -1082GG. As duas bandas em AG, um par ao lado do outro, representam um caso heterozigoto, sendo então -1082GA. As duas bandas em AA representam um caso homozigoto para o alelo A, sendo então -1082AA. A presença de dois fragmentos em cada posição genotipada é devida à amplificação conjunta do microssatélite IL10.G.

Tabela 5.15: Frequência genotípica dos SNPs -1082 (G/A) e -592 (A/C), e dos haplótipos proximais do promotor do gene da IL-10.

SNP/ Haplótipos		Frequencia (%)	
<b>-1082</b>	<b>Genótipo</b>		
	GG	13 (16,7)	
	GA	40 (51,3)	
	AA	25 (32,1)	
	Total	78 (100)	
<b>-592</b>	<b>Genótipo</b>		
	AA	5 (6,5)	
	AC	29 (37,7)	
	CC	43 (55,8)	
	Total	77	
<b>Haplótipos</b>			
-1082	-819	-592	
A	C	C	39 (32,2)
A	T	A	30 (25,8)
G	C	C	52 (42,9)
Total (n)			121

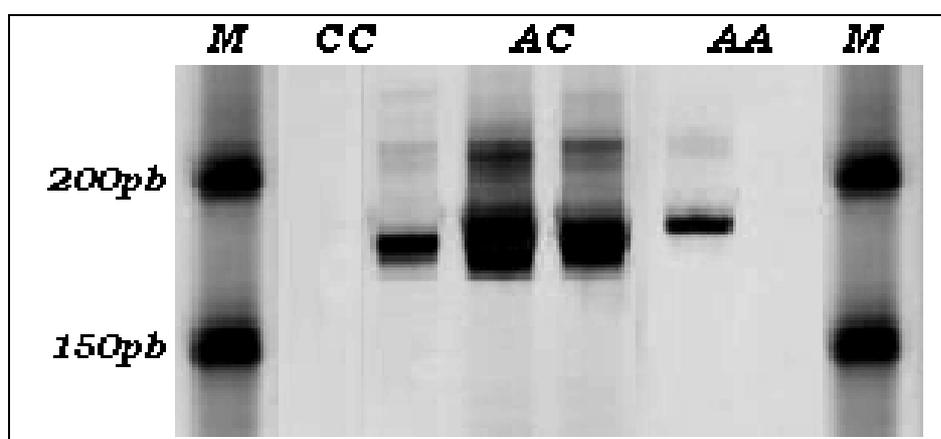


Figura 5.23: Detecção dos genótipos da posição -592 da IL10 em homo e heterozigose, por AS-PCRs. Gel de poliacrilamida 0,8% corado com nitrato de prata. M: Marcador de peso molecular 200 e 150pb.

### 5.5.2 Associações do Polimorfismo da Região Promotora da IL10 com as Características Histológicas

Os casos com mais células NMN em relação às células NUN (razão NMN/NUN >1) estiveram associados aos genótipos -1082GG ( $p= 0,01$ ,  $\chi^2$ ). Ao se

proceder a análise utilizando apenas os genótipos da posição -1082 em homozigose, verificou-se que um predomínio dos casos com a razão células NMN/NUN  $>1$  eram -1082GG (6/9, 66,7%), enquanto a maioria dos casos com mais células NUN (razão células NMN/NUN  $<1$ ) era -1082AA (20/26, 76,9%) ( $p= 0,038$ , teste de Fisher) (Tabela 5.16).

O genótipo -1082AA esteve associada a EN GI ( $p= 0,048$ , teste de Fisher). Já a análise por haplótipos mostrou que a presença do haplótipo GCC esteve associada à EN GII: dos 35 pacientes com o referido haplótipo, 20 (57,1%) estiveram associados à EN GII, enquanto dos 17 casos sem este haplótipo, 13 (76,5%) eram da EN GI ( $p= 0,037$ , teste de Fisher) (Tabela 5.17).

A presença do padrão interfolicular esteve associada ao genótipo -1082GG ( $p= 0,034$ , teste de Fisher) (Tabela 5.15). O haplótipo ACC este relacionado a ausência do padrão interfolicular ( $p= 0,009$ , teste de Fisher). Ressalta-se que dos 12 casos com padrão interfolicular avaliáveis para os SNPs estudados, 11 (91,7%) tinham o haplótipo GCC.

Os genótipos de IL10 estudados não estiveram associados à presença do EBV nas células tumorais.

Tabela 5.16: Associação dos SNPs da posição -1082 em homozigose do gene da IL10 com o balanço entre as células neoplásicas multinucleadas (NMN) e as células neoplásicas uninucleadas (NUN) e o padrão interfolicular.

VARIÁVEL	SNP -1082		TOTAL (%)	P
	-1082GG (%)	-1082AA (%)		
<b>Células NMN/NUN &gt;1</b>				
Sim	6 (66,7)	3 (33,3)	9 (100)	
Não	6 (23,1)	20 (76,9)	26 (100)	0,038
<b>Padrão Interfolicular</b>				
Sim	5 (71,4)	2 (28,6)	7 (100)	
Não	8 (25,8)	23 (74,2)	31 (100)	0,034

Células NMN/NUN >1: razão entre as células neoplásicas multinucleadas (NMN) e as células neoplásicas uninucleadas (NUN) maior do que 1, indicando que há mais células NMN em relação as células NUN.

Tabela 5.17: Associação do haplótipo proximal GCC com o grau e o risco da esclerose nodular (EN).

	GRAU DA EN		RISCO DA EN	
	I (%)	II (%)	Baixo (%)	Alto (%)
<b>GCC</b>				
Sim	15/35 (42,9)	20/35 (57,1)	13/35 (37,1)	22/35 (62,9)
Não	13/17 (76,5)	4/17 (23,5)	10/15 (66,7)	5/15 (33,3)
P	0,037		0,07	

Os casos com o genótipo -592CC estiveram associados a um maior número de eosinófilos no microambiente tumoral, ao contrário do genótipo -592AA que este associado a um menor número destas células (p= 0,04; teste de Mann-Whitney).

Não houve associação dos polimorfismos de IL10 com o imunofenótipo das células H-RS, com o número de mitoses das células neoplásicas e com o status do EBV.

### **5.5.3 Associações do Polimorfismo da Região Promotora da IL10 com as Características do Microambiente Tumoral**

Os polimorfismos da região -1082 estiveram associados a um aumento crescente no número de linfócitos Th2 (C-maf+), exibindo o genótipo GG o menor nível, o genótipo AA o maior nível e o genótipo AG nível intermediário ( $p= 0,01$ ; teste de Kruskal Wallis) (Figura 5.24). De fato, o genótipo -1082GG esteve associado ao menor número de linfócitos Th2 ( $p= 0,007$ ; teste de Mann-Whitney), enquanto o genótipo -1082AA exibiu um maior número destes linfócitos ( $p= 0,032$ ). Ainda, o genótipo -1082GG esteve relacionado ao balanço dos linfócitos FoxP3+/C-maf+, tendo os casos com este genótipo um maior número de linfócitos FoxP3+ em relação aos linfócitos C-maf+ ( $p= 0,01$ ; teste de Fisher), o contrário acontecendo no genótipo -1082AA em relação ao balanço destes linfócitos ( $p= 0,01$ ).

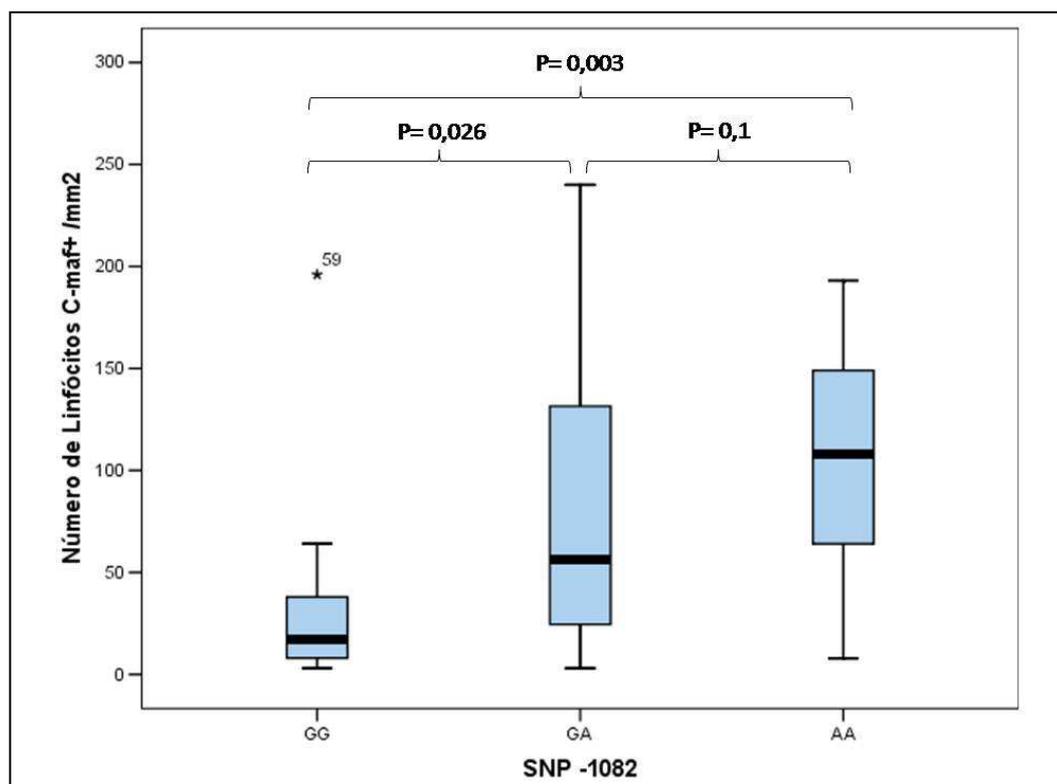


Figura 5.24: Distribuição do número de linfócitos Th2 (C-maf+) pelo SNP -1082. Ao se comparar todos os genótipos ao mesmo tempo a diferença é estatisticamente significativa ( $p= 0,01$ , teste de Kruskal Wallis). O mesmo acontece ao se comparar o genótipo GG com GA ( $p= 0,026$ , teste de Mann-Whitney) e GG com AA.

Já os polimorfismos da região -592 estiveram associados ao número de linfócitos CD3+ e CD8+ ( $p= 0,022$  e  $p= 0,014$ ; respectivamente; teste de Kruskal Wallis), tendo o genótipo AA o menor nível, o genótipo CC o maior nível e o genótipo AC nível intermediário (Figuras 5.25 e 5.26). Observou-se ainda associação limítrofe entre estes polimorfismos e o número de linfócitos C-maf+, com o genótipo AA mostrando o maior e o genótipo CC o menor número de células C-maf+ ( $p= 0,084$ ; teste de Kruskal Wallis) (Figura 5.27).

Ao se analisar os genótipos em homozigose para a posição -592, observou-se que o genótipo AA estava associado ao menor número de linfócitos CD3+ ( $p= 0,01$ ; teste de Mann-Whitney) e o genótipo CC ao maior número de linfócitos CD3+ ( $p= 0,05$ ), CD8+ ( $p= 0,005$ ), e FoxP3+ ( $p= 0,04$ ), além de menor

número de linfócitos C-maf+ ( $p= 0,03$ ). Na análise multivariada, foi mantida a significância estatística para os linfócitos CD8+ ( $p= 0,003$ ; IC95% -0,02 até -0,001), FoxP3+ ( $p= 0,039$ ; IC 95%, -0,002 até 0,0) e C-maf+ ( $p= 0,012$ ; IC95% 0,0 até 0,003) (Tabela A7, Anexo V).

A análise por haplótipos mostrou que o haplótipo GCC em homozigose (GCC/GCC) esteve associado a um menor número de linfócitos Th2 ( $p= 0,01$ ; teste de Mann-Whitney) e a um maior número de linfócitos FoxP3+ em relação aos linfócitos C-maf+ (razão FoxP3+/C-maf+  $>1$ ) ( $p= 0,002$ ; teste de Fisher). Na análise multivariada, o número de linfócitos C-maf+ manteve a significância estatística ( $p= 0,032$ ; IC95% 0,00 até 0,003).

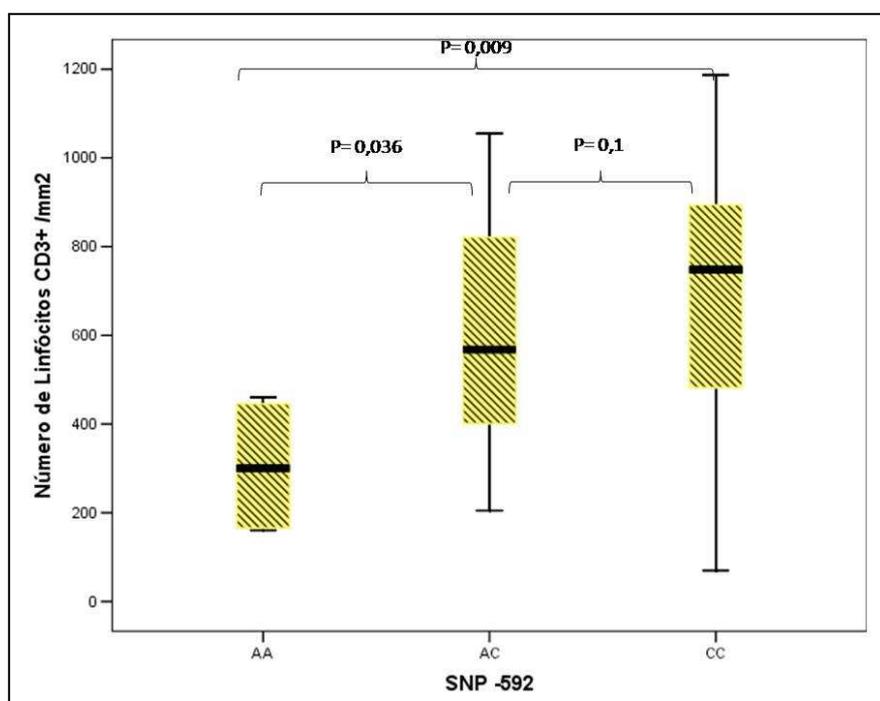


Figura 5.25: Distribuição do número de linfócitos CD3 pelo SNP -592. Ao se comparar todos os genótipos ao mesmo tempo a diferença foi estatisticamente significativa ( $p= 0,022$ ; teste de Kruskal Wallis).

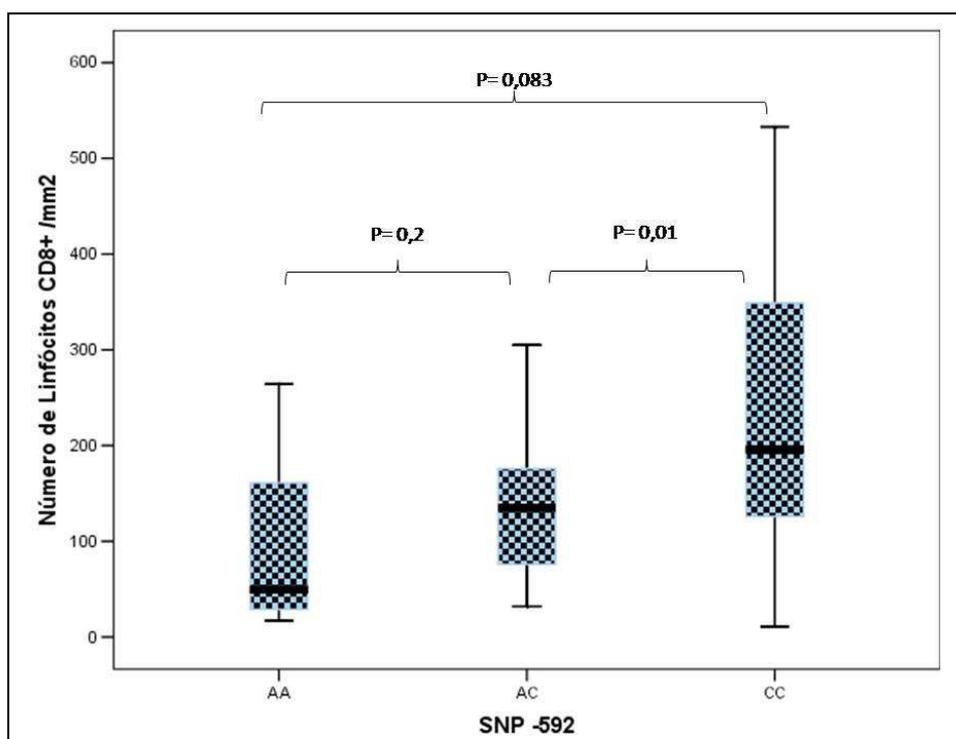


Figura 5.26: Distribuição do número de linfócitos CD8 pelo SNP -592. Ao se comparar todos os genótipos a diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,014$ ; teste de Kruskal Wallis).

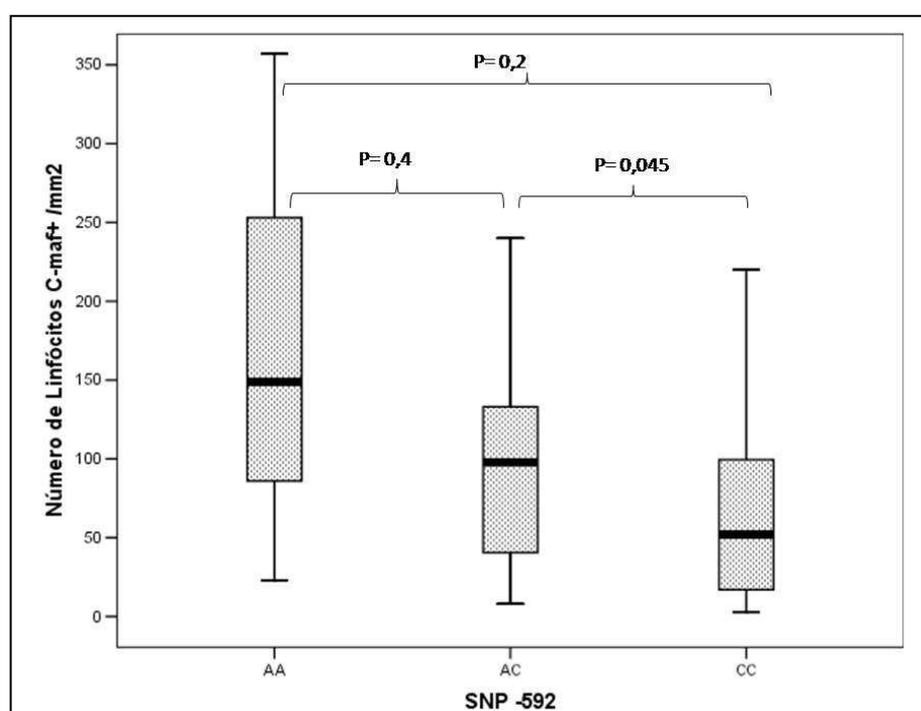


Figura 5.27: Distribuição do número de linfócitos C-maf+ pelo SNP -592. Ao se comparar todos os genótipos ao mesmo tempo a diferença mostra significância limítrofe ( $p=0,084$ , teste de Kruskal Wallis).

O haplótipo ACC esteve associado a um maior número de linfócitos CD3 ( $p= 0,035$ ; teste de Mann-Whitney), que foi mantida na análise multivariada (Tabela A7, Anexo V). Já o haplótipo ATA esteve relacionado a um maior número de linfócitos Th2 (C-maf+) ( $p= 0,028$ ) e a um menor número de linfócitos CD3+ ( $p= 0,025$ ), FoxP3+ ( $p= 0,053$ ) e Tia-1+ ( $p= 0,08$ ). Como esperado, este haplótipo esteve associado ao balanço de linfócitos FoxP3+/C-maf+, com um menor número de linfócitos FoxP3+ em relação ao número de linfócitos C-maf+ ( $p= 0,015$ ; teste de Fisher).

### **5.6 Contribuições do Polimorfismo do Gene CTLA4 para a Biologia do Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico**

As frequências genóticas e alélicas das posições -1722, +49 e CT60 encontradas nos pacientes com LHc estão descritas na tabela 5.18, enquanto as frequências dos principais haplótipos encontram-se na tabela 5.19. A figura 5.28 mostra um gráfico obtido pelo uso do programa de discriminação alélica para a posição CT60. Uma análise das frequências dos polimorfismos citados acima mostrou que o grupo de pacientes encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as posições: -1722A/G ( $p = 0,6$ ;  $\chi^2$ ), +49A/G ( $p = 0,78$ ;  $\chi^2$ ) e CT60A/G ( $p = 0,4$ ;  $\chi^2$ ).

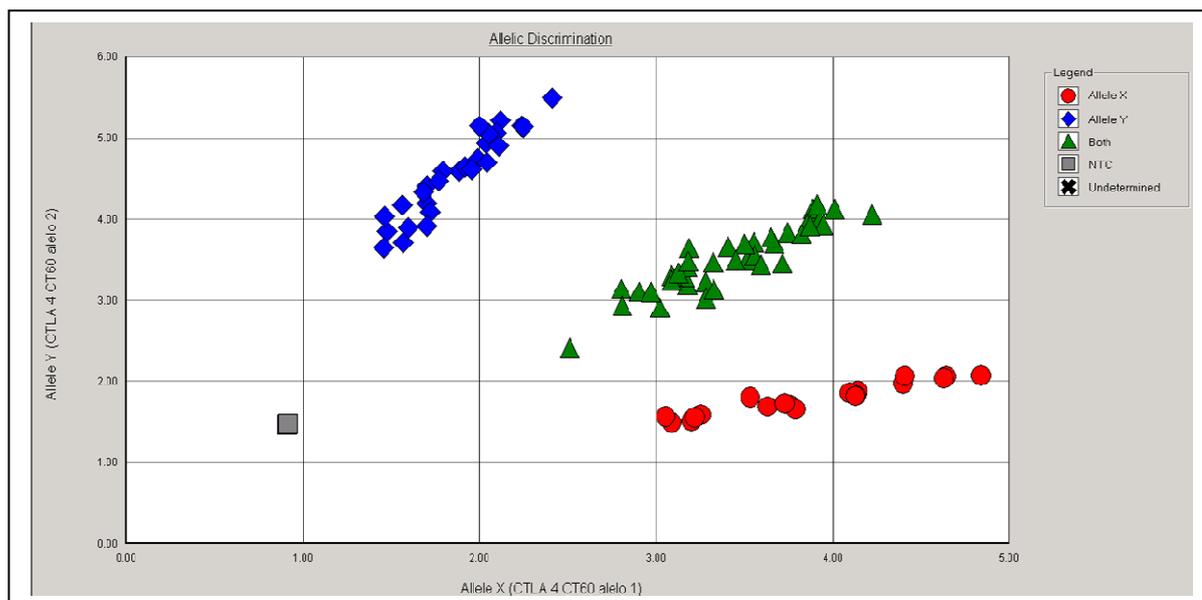


Figura 5.28: Gráfico de discriminação alélica do gene CTLA-4, posição CT60. (RS\_3087243). O ensaio foi realizado por PCR em tempo real, com sondas fluorogênicas para cada alelo. O grupamento de genótipos observado é baseado na fluorescência detectada para o alelo selvagem (A; fluoroforo VIC) e para o alelo mutante (G; FAM). As bolas na parte inferior do gráfico (eixo X) representam os casos homozigotos para o alelo A (CT60AA), os balões na parte superior do gráfico (eixo Y) representam os casos homozigotos para o alelo G (CT60GG) e os triângulos na parte central do gráfico representam os casos heterozigotos (CT60AG). Os quadrados na área de baixa fluorescência para VIC e FAM, representam os controles sem DNA (NTC).

Tabela 5.18: Freqüência genotípica dos SNPs -1722 (A/G), +49 (A/G) e CT60 (A/G) do gene CTLA-4.

SNP		NÚMERO	PERCENTUAL
<b>- 1722</b>	Genótipo		
	AA	66	83,5
	AG	13	16,5
	GG	0	0
	Total	79	100
<b>+49</b>	Genótipo		
	AA	43	51,2
	AG	28	33,3
	GG	13	15,5
	Total	84	100
<b>CT60</b>	Genótipo		
	AA	16	19,5
	AG	37	45,1
	GG	29	35,4
	Total	82	100

Tabela 5.19: Freqüência dos haplótipos mais comuns do gene CTLA4 em relação aos polimorfismos das regiões +49 e CT60.

HAPLÓTIPO			Frecuencia (%)
	<b>+49</b>	<b>CT60</b>	
1	A	A	56 (41,5)
2	A	G	38 (28,1)
3	G	A	2 (1,5)
4	G	G	39 (28,9)
Total (n)			135

### 5.6.1 Associação de polimorfismos de CTLA4 com características clínico-biológicas do LHc

Em relação à posição -1722, a única associação observada foi entre a presença do alelo G e grupo de risco favorável (10/13 casos) ( $p = 0,037$ ,  $\chi^2$ ).

O genótipo CT60 GG esteve associado a um alto IPC, sendo que 20/28 (71,4%) casos CT60GG exibiram Ki67>50% nas células H-RS ( $p = 0,037$ ,  $\chi^2$ ).

Tendência semelhante foi observada com a posição +49, em que casos com genótipo GG 10/13 (76,9%) mostraram alto IPC ( $p= 0,08$ ;  $\chi^2$ ).

### **5.6.2 Associação dos Polimorfismos de CTLA4 com as Características do Microambiente Tumoral no LHc**

A análise da posição +49 mostrou que a presença do alelo A, em qualquer dose esteve associada a um nível de linfócitos CD3+ superior ao percentil 25 ( $>451 /\text{mm}^2$ ) ( $p= 0,033$ ;  $\chi^2$ ).

Enquanto a presença do alelo +49G foi relacionada ao menor número de linfócitos CD4+ ( $p= 0,046$ ; teste de Mann-Whitney) (Figura 5.29). A população CD4+ pareceu estar influenciada mais pela composição haplotípica (haplótipo +49A/CT60A, ver adiante) que pela configuração genética em cada posição.

A presença do genótipo +49AA influenciou o balanço entre as subpopulações linfocitárias. Os portadores de +49AA mostraram mais linfócitos C-maf+ em relação aos linfócitos T-bet+, com uma razão T-bet/C-maf $<1$  em 26/41 (63,4%) dos casos ( $p= 0,046$ ;  $\chi^2$ ). O mesmo foi observado em relação ao balanço entre os linfócitos FoxP3+ e CD20+: 32/53 (60,4%) dos casos +49AA tiveram maior número de linfócitos CD20+ em relação aos linfócitos FoxP3+ ( $p= 0,047$ ;  $\chi^2$ ) (Tabela 5.20).

Os portadores do alelo CT60A exibiram um nível de linfócitos CD4+  $>$ percentil 25 ( $>70 /\text{mm}^2$ ) ( $p= 0,02$ ;  $\chi^2$ ). Por sua vez, os portadores do alelo G mostram maior número de linfócitos FoxP3+ ( $p= 0,068$ ; Mann-Whitney) (Figura 5.32) e nível de linfócitos FoxP3+  $>$  percentil 25 ( $>12 /\text{mm}^2$ ) (47/58; 81%) ( $p= 0,007$ ;  $\chi^2$ ). Já o genótipo CT60GG esteve associado a um alto nível de linfócitos CD8+ ( $>143 /\text{mm}^2$ ) ( $p= 0,014$ ;  $\chi^2$ ) (Tabela 5.20).

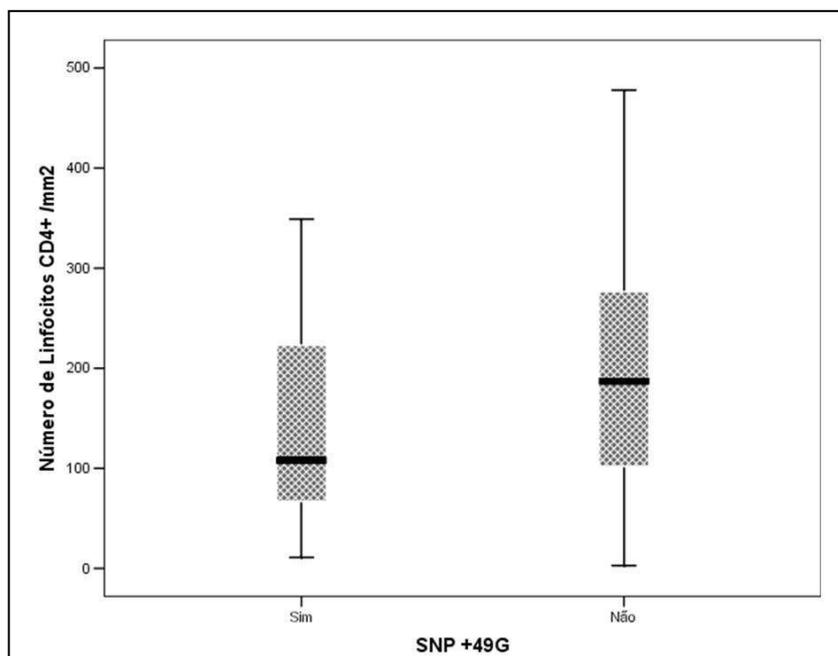


Figura 5.29: Relação entre o alelo +49G do gene CTLA-4 e o número de linfócitos CD4+ /mm<sup>2</sup>.

O genótipo CT60AA esteve relacionado ao menor número de linfócitos FoxP3+ ( $p= 0,068$ , Mann-Whitney) (Figura 5.30), enquanto os casos sem este genótipo estiveram associados ao nível de linfócitos FoxP3+ > perc. 25 ( $>12 /\text{mm}^2$ ) ( $p= 0,017$ , teste de Fisher) (Tabela 5.20).

A análise dos haplótipos mostrou que os portadores do haplótipo +49A/CT60A tiveram uma quantidade linfócitos CD4+ superior ao percentil 25 ( $p= 0,023$ ; teste de Fisher) e uma quantidade de linfócitos CD8 inferior ao percentil 50 ( $p= 0,009$ ). Por outro lado, a maioria os casos com balanço FoxP3+/CD20+  $>1$  (12/18; 66,7%) eram portadores do haplótipo +49G/CT60G ( $p= 0,023$ ; teste de Fisher) (Tabela 5.21).

Tabela 5.20: Principais associações significativas entre os genótipos da posição +49 e CT60 do gene CTLA-4 com características do linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	+49AA		+49GG		CT60 AA		CT60GG	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
<b>IPC</b>								
≥50%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	20/28 (71,4)*	24/51 (47,1)
<50%							8/28 (28,6)	27/51 (52,9)
<b>Linfócitos CD3+</b>								
> 451 /mm <sup>2</sup>	NS	NS	6/13 (46,2)	47/62 (75,8)*	NS	NS	NS	NS
≤ 451 /mm <sup>2</sup>			7/13 (53,8)	15/62 (24,2)				
<b>Linfócitos FoxP3+</b>								
> 70 /mm <sup>2</sup>	NS	NS	NS	NS	7/15 (46,7)	47/58 (81)*	NS	NS
≤ 70 /mm <sup>2</sup>					8/15 (53,3)	11/58 (19)		
<b>Linfócitos CD8+</b>								
> 143 /mm <sup>2</sup>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	18/27 (66,7)*	17/46 (37)
≤ 143 /mm <sup>2</sup>							9/27 (37)	29/46 (63)
<b>T-bet+/C-maf+ &gt;1</b>								
Sim	10/36 (27,8)	16/31 (51,6)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Não	26/36 (72,2)*	15/31 (48,4)						
<b>FoxP3+/CD20+ &gt;1</b>								
Sim	7/22 (31,8)	19/52 (36,5)	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Não	15/22 (68,2)*	33/52 (63,5)						

NS: associação estatisticamente não significativa. \*, valor de p <0,05. IPC: índice de proliferação celular das células neoplásicas. T-bet+/C-maf+ >1: balanço entre o número de linfócitos T-bet e C-maf. FoxP3+/CD20+ >1: balanço entre o número de linfócitos FoxP3+ e CD20+.

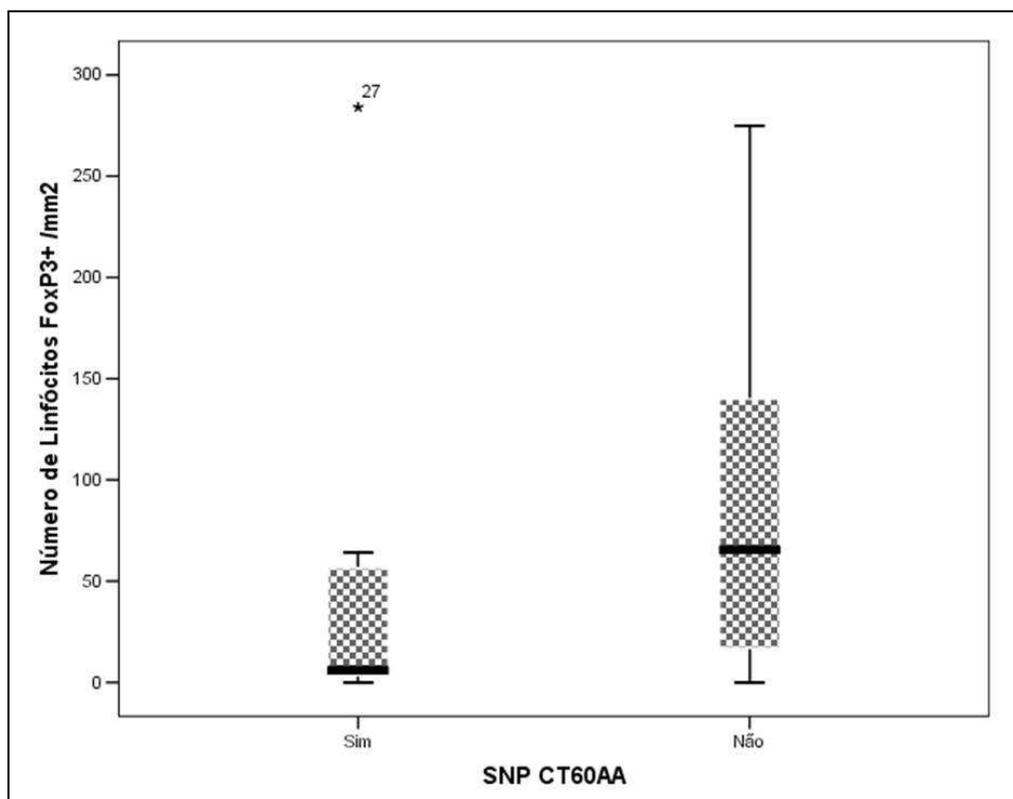


Figura 5.30: Relação entre a presença do genótipo CT60AA e o número de linfócitos FoxP3+ /mm<sup>2</sup>.

Tabela 5.21: Principais associações entre os haplótipos formados pelos alelos da posição +49 e CT60 do gene CTLA-4 com características do linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	+49A/CT60A		+49G/CT60G	
	Sim	Não	Sim	Não
<b>Linfócitos CD4+</b>				
> 70 /mm <sup>2</sup>	40/47 (85,1)*	16/26 (61,5)	NS	NS
≤ 70 /mm <sup>2</sup>	7/47(14,9)	10/26 (38,5)		
<b>Linfócitos CD8+</b>				
> 143 /mm <sup>2</sup>	17/48 (35,4)	18/27 (66,7)	NS	NS
≤ 143 /mm <sup>2</sup>	31/48 (64,6)**	9/27 (33,3)		
<b>FoxP3+/ CD20+ &gt;1</b>				
Sim	NS	NS	12/31 (38,7)	6/40 (15,0)
Não			19/31 (61,3)*	34/40 (85,0)

NS: não estatisticamente significativo. \* valor  $p < 0.05$ ; \*\* valor  $p < 0.001$ . FoxP3+/CD20+ >1: balanço entre o número de linfócitos FoxP3+ e CD20+.

Os polimorfismos da posição -1722 do gene CTLA-4 não se associaram às características do microambiente tumoral e das células neoplásicas.

### 5.6.3 Os Polimorfismos do Gene CTLA-4 no Prognóstico do Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico

A fim de investigar se os SNPs do gene CTLA-4 estudados teriam impacto na SLE, as curvas de sobrevida dos pacientes foram analisadas em relação às variantes genéticas e dos principais haplótipos (+49A/CT60A e +49G/CT60G), e comparadas com testes de Log-rank.

Uma melhor SLE foi observada nos casos com genótipo +49AA ( $p=0,045$ , Log-rank). Por outro lado, a presença do haplótipo +49G/CT60G esteve associada a uma pior SLE ( $p=0,015$ , Log-rank) (Figura 5.31).

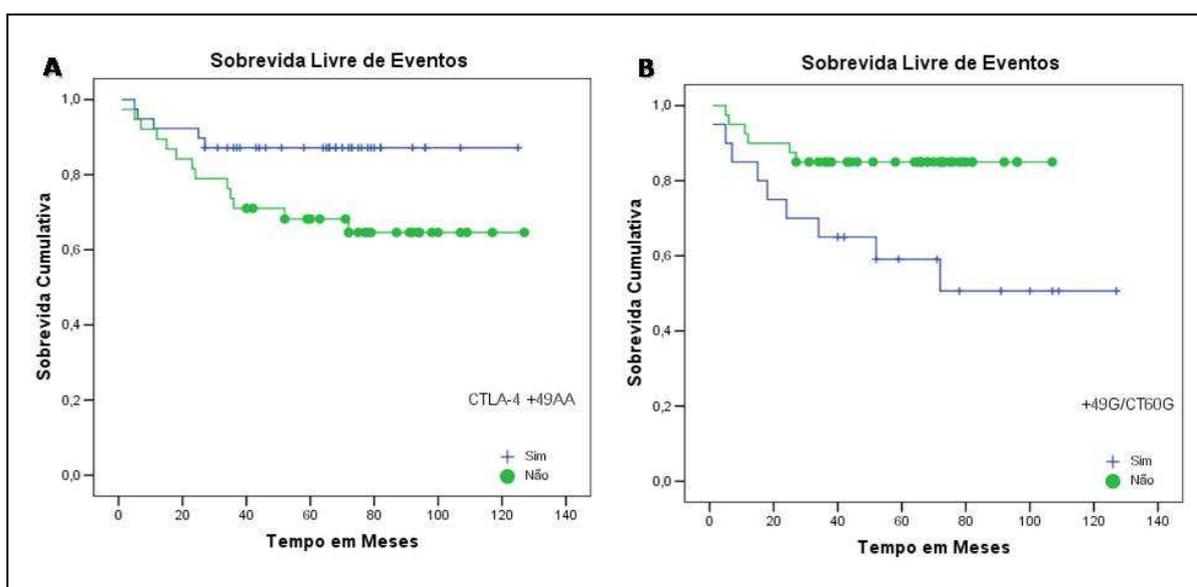


Figura 5.31: Sobrevida livre de eventos em relação à presença ou a ausência do genótipo +49AA (A) e haplótipo +49G/CT60G (B) do gene CTLA-4.

Em relação ao impacto clínico dos haplótipos 1 (+49 A / CT60 A) e 4 (+49 G / CT60 G), em ambos os casos, a SLE foi dependente do estatus de associação do tumor com EBV. Os portadores do haplótipo 1 EBV+ tiveram SLE melhor que os portadores de outros haplótipos (95,5 vs. 66,7%;  $p=0,015$ ; Log-rank); assim como

melhor SLE que os portadores do haplótipo 1 EBV- (95,5 vs. 74,1%;  $p= 0,041$ ; Log-rank).

No sentido oposto, os portadores do haplótipo 4 EBV+ tiveram pior SLE que os casos EBV- (73,3 vs. 100%;  $p= 0,043$ ; Log-rank).

Ao se utilizar as variáveis clínicas e do microambiente associadas à SLE neste estudo (doença extranodal e nível de células Granzima B+) e o haplótipo +49G/CT60G na regressão de Cox, ajustada para o estatus do EBV, observou-se que a presença do referido haplótipo manteve o impacto prognóstico ( $p= 0,043$ ; IC95% 0,3 até 0,51) (Tabela 5.22).

Tabela 5.22: Regressão de Cox das variáveis clínicas, histológicas e genéticas associadas estatisticamente com a sobrevida livre de eventos.

VARIÁVEIS	p	HR	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Doença Extranodal	0,004	0,12	0,3	0,51
Nível de Granzima B>perc. 25	0,027	0,09	0,01	0,75
Haplótipo +40G/CT60G	0,043	0,28	0,08	0,95

## 6- DISCUSSÃO

### 6.1 Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico no Rio de Janeiro: Um Padrão Epidemiológico Distinto ?

Os estudos prévios realizados no Rio de Janeiro com o linfoma de Burkitt pediátrico mostraram que nesta região geográfica tanto a associação com o EBV<sup>175, 184, 61</sup> quanto as características de apresentação clínica da doença diferiam dos dois padrões epidemiológicos descritos e endossados pela OMS<sup>1</sup>: linfoma de Burkitt endêmico e linfoma de Burkitt esporádico. Estes estudos permitiram sugerir a existência de uma terceira entidade epidemiológica, com características clínico-epidemiológicas intermediárias entre os dois padrões reconhecidos<sup>7</sup>.

Questionou-se se no LHc pediátrico, uma neoplasia também associada ao EBV em uma parte dos casos, haveria diferenças em relação aos modelos apoiados pela literatura, quanto às características de associação com este vírus, grupos etários e subtipos histológicos, na região geográfica objeto deste estudo (RJ). Em 2007, nós mostramos inicialmente<sup>8, 185</sup> que as características epidemiológicas e histológicas do LHc pediátrico no RJ pareciam diferir do esperado para os países em desenvolvimento (vide anexo VIII).

Armstrong et al<sup>6</sup> hipotetizaram para o LHc um modelo de 3 doenças com base na idade ao diagnóstico e o status do EBV. A primeira entidade é uma doença tipicamente da infância associada ao EBV, com alta incidência nos países em desenvolvimento e usualmente do subtipo CM. O desenvolvimento do LH é provavelmente associado à primo-infecção precoce do EBV (pré-escolares, predominantemente) nos países economicamente menos desenvolvidos. A segunda entidade acomete preferencialmente idosos, é também associada ao EBV e geralmente do subtipo CM. Neste caso, a doença parece estar relacionada aos

eventos de reativação do EBV. Por fim, a terceira entidade afeta preferencialmente adultos jovens, é mais prevalente em países desenvolvidos, geralmente do subtipo EN e não associada ao EBV.

Nas regiões com maior desenvolvimento sócio-econômico, a frequência de associação do LHc com o EBV é de cerca de 40%<sup>29</sup>. Por outro lado, uma frequência maior de associação do EBV com o LHc pediátrico na América Latina tem sido descrita, muitas vezes com um percentual de associação de até 100%<sup>9-10</sup>.

Nas regiões menos favorecidas, o LHc pediátrico afeta crianças jovens ( $\leq 10$  anos) numa proporção elevada (geralmente em mais de 50% dos casos), é do subtipo CM na maioria dos pacientes (geralmente em mais de 50% dos casos) e tem elevada associação com o EBV<sup>7, 186-191</sup>. Em países desenvolvidos, o LHc pediátrico afeta adolescentes na maioria das vezes (geralmente em mais de 50% dos casos), é EN na grande maioria e tem baixa associação com o EBV (geralmente em torno dos 40%)<sup>6, 40, 55, 59, 187-188, 192-200</sup>.

Nos casos de LHc pediátrico oriundos do RJ, uma região com desenvolvimento sócio-econômico intermediário, foi possível observar um “deslocamento” do padrão epidemiológico observado nas regiões pobres em direção ao padrão epidemiológico observado nas regiões mais ricas: mais casos em adolescentes, associação intermediária com o EBV e maior frequência da EN (que mostra uma alta associação com o EBV: 26 dos 43 casos associados ao EBV são de EN). Em resumo, nós observamos mais casos de EN do que de CM, similarmente aos países desenvolvidos. O EBV não mostrou associação com os grupos etários ( $\leq 10$  anos x  $> 10$  anos), semelhante ao observado nos países mais pobres. Finalmente, a proporção de casos de EN associada ao EBV foi intermediária entre países desenvolvidos e pobres.

Em vista disto, nós propomos que o LHc pediátrico no sudeste do Brasil não pertence aos padrões epidemiológicos descritos por Armstrong et al<sup>6</sup> e Harris et al<sup>42</sup>, e está em marcado contraste com o LHc pediátrico observado no nordeste do Brasil (uma região menos desenvolvida), o qual mostra alta associação com o EBV (87% dos casos) e prevalência da CM (caracteristicamente, padrão epidemiológico do tipo I)<sup>60</sup>.

O maior nível sócio-econômico observado em algumas regiões de países em desenvolvimento poderia promover uma mistura de fatores culturais, ambientais e de saúde pública que permitiria uma infecção precoce do EBV associada a um melhor funcionamento do sistema imune e diminuição de outras doenças infecciosas na infância. Isto poderia contribuir para o desenvolvimento do LHc em adolescentes. De fato, 70% das crianças com até 9 anos de idade no sudeste do Brasil têm anticorpos contra o capsídio viral do EBV<sup>53, 201</sup>. Este seria o cenário onde o LHc pediátrico teria uma prevalência de casos EN, uma associação com o EBV intermediária entre países ricos e pobres, e uma alta frequência de casos de EN associados ao EBV, como observado em nossa série de casos.

Divergências no emprego dos critérios histológicos para o diagnóstico dos subtipos histológicos podem ser responsáveis por parte das discrepâncias observadas na literatura entre os subtipos EN e CM. Na EN, o grau de colagenização e o padrão de proliferação celular variam grandemente caso a caso e até num mesmo linfonodo. Ainda, a esclerose pode ser predominantemente celular e a formação de bandas colágenas com a conseqüente delimitação de nódulos ocorrer apenas numa pequena porção do espécime; a chamada EN mínima ou fase celular da EN<sup>30</sup>. De maneira característica, a EN mínima apresenta espessamento focal da cápsula do linfonodo da qual emerge uma banda de colágeno que se estende em

direção ao interior do linfonodo, porém sem produzir um nódulo distinto<sup>30-31</sup>. São nestes casos de EN mínima em que há erros na categorização do subtipo do LHc e conseqüentemente, casos que deveriam ser classificados como EN são erroneamente chamados de CM. Neste estudo, atenção especial foi dada na distinção entre a fase celular da EN e a CM<sup>30-31, 202</sup>.

## **6.2 O Subtipo Histológico Celularidade Mista é um Reflexo da Constituição do Microambiente Tumoral**

A heterogeneidade histológica do LHc é uma das suas principais características e é também um dos elementos fundamentais dos modelos epidemiológicos que tentam explicar diferenças na incidência idade-dependente e associação com o EBV. Entretanto, não existe até o momento uma explicação dos processos subjacentes à histopatogênese ou das condições biológicas que favoreçam aparecimento dos diferentes subtipos nas distintas situações sócio-geográficas. Tem-se discutido se o desenvolvimento do subtipo histológico estaria relacionado com a produção de citocinas pelas células H-RS<sup>48</sup>. Recentemente, tem-se questionado se a CM representaria uma entidade diferente da EN em relação a patogênese<sup>203</sup>, porém até o momento nada foi comprovado.

O subtipo histológico do LHc em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana é influenciado pelo número de linfócitos T CD4+ no sangue periférico, sendo a EN observada predominantemente nos casos com grande número de linfócitos T CD4+, enquanto a CM predomina nos casos com menor número destes linfócitos<sup>204</sup>.

É sabido que no sangue periférico, as crianças possuem maior número de linfócitos CD20+ do que CD4+, em relação aos adultos<sup>16-17</sup>. Assim, foi levantada a

hipótese de que o número de linfócitos T CD4+ e CD20+ no microambiente tumoral do LHc pudesse influenciar os subtipos histológicos. A análise mostrou que os casos com CM apresentavam um número menor de linfócitos T CD4+ /mm<sup>2</sup>, maior número de linfócitos CD20+ /mm<sup>2</sup> e razão entre linfócitos CD4+/CD20+ <1. Na análise multivariada, a CM esteve associada à presença do EBV (p= 0,045, IC95% 0,00 a 0,38) e à razão CD4/CD20 <1 (p= 0,014, IC95% -0,43 a -0,05). Isto sugere que esta composição do microambiente (menor número de linfócitos T CD4+ em comparação ao número de linfócitos CD20+) seria um reflexo dos processos celulares subjacentes ao desenvolvimento da CM.

Nossa hipótese é de que o desenvolvimento da CM nas crianças com LHc não é uma consequência direta da primoinfecção pelo EBV em idades precoces, uma vez que as crianças no Brasil são primariamente expostas ao EBV na primeira infância<sup>53, 201, 205</sup>. Ao invés disto, a histopatogênese da CM poderia estar relacionada a uma resposta imune deficitária contra o EBV, refletida pela baixa razão entre linfócitos CD4+/CD20+. Já a EN poderia ser originada predominantemente num contexto de melhor resposta contra o EBV e/ou antígenos tumorais expressos nas células H-RS.

Os resultados obtidos desta análise nos permitiu a formulação de novas hipóteses sobre um aspecto tão pouco explorado, como é a histopatogênese no LHc. Entretanto, é de remarcar que, até o nosso conhecimento, é a primeira vez que se avança numa hipótese baseada na interface imunológica para explicar a diversidade histológica desta doença.

### **6.3 O Microambiente Tumoral no Linfoma de Hodgkin Clássico tem Características Particulares na Infância**

O LHc é uma doença cuja a heterogeneidade histológica é marcante, a começar pelas células neoplásicas que podem exibir grande pleomorfismo num mesmo tumor<sup>70</sup>. A presença de bandas colágenas, graus variáveis de fibrose e diferenças morfológicas no número e tipo das células inflamatórias do microambiente tumoral (linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, monócitos, plasmócitos e macrófagos) são característicos desta neoplasia<sup>1</sup>.

Com a modernização dos estudos imunohistoquímicos foi possível o início da categorização dos linfócitos T presentes no microambiente deste linfoma. O papel funcional destas células inflamatórias não é completamente entendido. Especificamente, não está claro se elas refletem uma resposta imunológica contra as células tumorais e, neste caso, como as células H-RS evadiriam deste desafio imune. Os linfócitos T citotóxicos e Th1 são mediadores efetivos da imunidade anti-tumoral, entretanto os linfócitos Th2 podem contribuir para o crescimento neoplásico através da manutenção de um microambiente tumoral imunossuprimido<sup>9</sup>. As células H-RS expressam e secretam mediadores que atraem células Th2<sup>48</sup> e Tregs para o microambiente do LHc<sup>95</sup> que poderiam potencialmente contribuir para imunossupressão local através da secreção de IL10 ou TGF $\beta$ , além das interações por contato via CTLA4<sup>9, 95</sup>.

Atualmente, a carcinogênese é vista não mais como um fenômeno apenas da célula tumoral, mas como um processo que acomete tecidos, uma vez que o microambiente tumoral torna-se parte integrante deste processo<sup>206</sup>. E dentro desta concepção o processo inflamatório possui papel decisivo por controlar não só o número e o tipo das células que compõem o infiltrado inflamatório (sejam elas

células do sistema imune ou não, como os fibroblastos), como também a angiogênese<sup>206</sup>.

O microambiente tumoral no LHc tem sido considerado uma manifestação imune do hospedeiro às células neoplásicas<sup>77</sup>. Baseado neste conceito, é importante ter em mente que, até o momento, todos os estudos sobre o microambiente tumoral no LHc foram realizados em adultos ou uma mistura de adolescentes e adultos. Desta forma, ainda não está estabelecido se crianças e adolescentes teriam diferenças quanto às populações linfocitárias, em comparação aos adultos. Esta questão é pertinente, já que existem diferenças imunológicas entre crianças e adultos<sup>14-15</sup> e estas diferenças poderiam determinar variações na resposta, não apenas contra as células H-RS, mas também contra o EBV nos casos associados a este vírus.

A comparação dos números de cada população celular entre os estudos publicados não é possível já que diferentes metodologias são utilizadas, como por exemplo, percentual de células por mm<sup>2</sup>, número de células por mm<sup>2</sup> ou o número de células por um campo de grande aumento (40x)<sup>11, 13, 99</sup>. Porém, ao se analisar as freqüências relativas das populações linfocitárias investigadas neste estudo e comparar com a dos outros, é possível afirmar que não existem diferenças marcantes nas freqüências das células Tregs (determinadas a partir da imunoexpressão de FoxP3), células Th1 (imunoexpressão de T-bet) e células Th2 (expressão de C-maf) em relação ao observado no LHc do adulto. Schreck et al<sup>99</sup> encontraram, em consonância com este estudo, similar freqüência de linfócitos Tregs e Th2; maior número de linfócitos Th2 em relação aos linfócitos Th1; e linfócitos Th1 em maior número do que os linfócitos T citotóxicos ativados (Granzima B+). Neste estudo, encontramos diferenças na contagem absoluta das população

celulares em relação ao estudo de Schreck et al<sup>99</sup>; porém, apesar de termos utilizado o mesmo programa para análise das populações linfocitárias, não é possível afirmar se estas diferenças são secundárias a idade ou aos parâmetros de análise.

Por sua vez Tzankov et al<sup>13</sup>, utilizando também o parâmetro “linfócitos /mm<sup>2</sup>” na população adulta, encontrou menor número de linfócitos Tregs em relação a nossos achados em crianças (média de 42 linfócitos/mm<sup>2</sup> vs. 101,64 linfócitos/mm<sup>2</sup>, respectivamente). Porém, mais uma vez é possível que estas diferenças numéricas sejam devidas à metodologia de análise.

Em acordo com Álvaro et al<sup>12</sup>, nós observamos maior número de linfócitos Tia-1+ em relação ao número de linfócitos FoxP3+ e Granzima B+. Neste estudo, entretando, o maior número de linfócitos FoxP3+ em relação ao número de linfócitos Granzima B+ foi semelhante ao mostrado por Kelley et al<sup>207</sup>.

Porém, dentro da população pediátrica analisada, é evidente a diminuição do número de células Th1, CD8 e B com o aumento da idade. Esta característica não parece ser secundária à presença do EBV já que neste estudo não foi encontrada uma associação entre este vírus e os grupos etários. As características observadas em relação às células Th1 e CD8 e a idade, podem corresponder a diferenças fisiológicas do sistema imune entre crianças mais novas e crianças mais velhas ou corresponder a diferenças na resposta imune frente ao desafio imunológico deferido pelas células neoplásicas.

A contribuição quantitativa dos linfócitos B (CD20+) no microambiente tumoral do LHc é pouco descrita tanto em adultos quanto em crianças. Esta população de linfócitos tem sido avaliada, sobretudo, em relação ao impacto prognóstico<sup>113</sup>. Neste grupo pediátrico, foi observada uma grande quantidade de células infiltrantes CD3+ em comparação às células CD20+. Entretanto, ao se

comparar as diversas populações de linfócitos T com a de linfócitos B, observa-se que o número de linfócitos B é maior do que o número de linfócitos da cada população T individualmente (CD4+, Treg, Th1+, Th2+, CD8+ e citotóxicos). Esta característica é diferente da observada em adultos com LHc os quais exibem mais linfócitos T CD4+ do que linfócitos B CD20+<sup>208</sup>. Estas diferenças no microambiente tumoral podem ser conseqüentes ao maior número de linfócitos CD20+ em relação ao número de linfócito CD4+ observado no sangue periférico de crianças, quando comparado ao de adultos<sup>16-17</sup>; sugerindo que diferenças imunológica entre os grupos etários poderiam influenciar a composição do microambiente tumoral.

No câncer coloretal, é bem reconhecido que os casos com maior número de linfócitos T no microambiente tumoral estão associados a doença menos agressiva<sup>209-210</sup>; porém, pouco se sabe a respeito do LHc. Neste estudo, elevado número de linfócitos T CD3+ foi associado com baixo estadiamento, indicando a presença de uma imunovigilância mais efetiva. Grande número de linfócitos T CD3+ foi também associado com a presença de sintomas B. É possível que, pelo menos em parte, a febre seja conseqüente a produção de citocinas durante proliferação das células T, como observado na mononucleose infecciosa, uma doença caracterizada pela proliferação de células T devido à primoinfecção com o EBV, e associada a sintomas similares aos do LHc, como febre e fadiga, os quais são secundários a produção de citocinas secretadas durante a fase expansiva das células T<sup>29</sup>.

#### 6.4 O Vírus Epstein-Barr Influencia as Características do Microambiente Tumoral no LHc Pediátrico

Embora muitos estudos *in vitro* tenham mostrado que o EBV pode induzir a maior produção de citocinas envolvidas na migração de células Treg<sup>77, 211</sup>, neste estudo não foram observadas diferenças no número de linfócitos CD4+, FoxP3+ e C-maf+ entre os casos EBV+ e EBV-. Ao contrário, foi visto um maior número de linfócitos CD8+, Tia-1+, Granzima B+ e T-bet+ (Th1) nos casos associados ao EBV. Recentemente, Chetaille et al<sup>113</sup> descreveram a assinatura molecular dos casos de LHc associados ao EBV, a qual é caracterizada por genes associados com a resposta Th1 e antiviral, validada agora pela primeira vez na população pediátrica e confirmando o recrutamento de células T citotóxicas potencialmente hábeis em exercer a resposta imune contra o EBV.

No grupo EBV+, os resultados de pior SLE nas crianças com maior número de linfócitos FoxP3+, razão FoxP3/CD8 >1 e razão FoxP3/Tia-1 >1 sugerem que: 1) a resposta imune contra o EBV é mediada pelos linfócitos CD8+ e 2) os linfócitos FoxP3+ estão inibindo a resposta imune direcionada contra o EBV, como mostrado em estudos *in vitro*<sup>212-213</sup>. Ainda nos casos EBV+, uma pior SLE associada à presença do granuloma e da razão T-bet/C-maf >1 sugere que a resposta não mediada pelos linfócitos CD8+ seria ineficiente em destruir as células H-RS EBV+.

O prognóstico favorável do EBV observado neste grupo, contrariamente ao prognóstico desfavorável relatado nos casos adultos, não dá suporte a hipótese que o EBV exerceria um papel chave no escape imune em crianças com LHc associado a este vírus<sup>10, 214-215,200, 216-217</sup>.

Como nos adultos<sup>11-12</sup>, o excesso de células citotóxicas neste grupo de LHc EBV-negativo foi independentemente associado a pior SLE e uma tendência de

melhor SLE foi observada nos casos com balanço entre os linfócitos FoxP3+/C-maf+ >1 (p= 0,096, Log-rank). Estes resultados estão em concordância com o modelo clássico recentemente emergido dos estudos feitos em adultos com LHc, no qual as células Tregs seriam capazes de exercer resposta imune contra as células H-RS e as células T CD8+ geradas contra as células neoplásicas seriam incapazes de exercer a resposta imune por serem induzidas a um estado tolerogênico, apesar de proliferarem em resposta aos antígenos tumorais<sup>218-219</sup>.

Baseada na descrição de que células Tregs poderiam exercer citotoxicidade<sup>220</sup>, foi realizada a investigação deste grupo de células no microambiente tumoral do LHc pediátrico. Apenas um pequeno número de crianças exibiram células FoxP3+/Granzima B+, confirmando a existência da população de células Tregs expressando Granzima B; estas células estiveram presentes, sobretudo, nos casos com grande número de células T CD4+. A explicação mais plausível é que a presença desta pequena população no microambiente tumoral seja uma consequência do maior influxo de células CD4+ para o microambiente. É possível, entretanto, que as células Tregs citotóxicas recrutadas para o microambiente tumoral do LHc tenham um fenótipo distinto, ainda não descrito.

## **6.5 O Estatus Proliferativo das Células Benignas do Microambiente Tumoral Influencia a Sobrevida no Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico**

Pela primeira vez na literatura, o índice de proliferação celular dos linfócitos benignos foi avaliado no microambiente tumoral do LHc. Foi observado associação entre um grande número destes linfócitos Ki67+ e diversas populações linfocitárias estudadas (FoxP3+, CD8+, Tia-1+, Granzima B+, T-bet+ e C-maf+), sugerindo que estas populações linfocitárias além de serem recrutadas da periferia,

são capazes de proliferar, provavelmente em resposta a algum estímulo antígeno-dependente ou independente. Não está definido se estes linfócitos teriam a capacidade de exercer alguma resposta imune anti-tumor.

O fato dos casos com grande número de linfócitos benignos Ki67+ estarem associados a um prognóstico desfavorável, faz-nos hipotetizar que parte destes linfócitos Ki67+ não são capazes de destruir as células tumorais e devam ser Tia-1+ e/ou Granzima B+ (populações celulares implicadas no pior prognóstico do LHc, tanto neste estudo como em outros<sup>10-12, 207</sup>).

É provável que estes linfócitos proliferantes sejam os responsáveis pela positividade da tomografia por emissão de pósitrons utilizando fluorodeoxiglicose, a qual está associada a um prognóstico desfavorável no LHc, quando presente após 2 ciclos de ABVD<sup>221-223</sup>. Um significado biológico definitivo destes achados necessita de uma descrição mais aprofundada em relação ao imunofenótipo destas células proliferantes e seu estatus funcional.

## **6.6 A Combinação de Variáveis do Hospedeiro e do Tumor Prediz o Prognóstico no LHc Pediátrico**

O LHc é uma doença que afeta tipicamente crianças e adultos jovens, com mais de 80% dos pacientes sendo curados com a poliquimioterapia atual<sup>224</sup>. Uma das conseqüências desta alta taxa de cura é que uma fração dos pacientes irão receber um excesso de tratamento antineoplásico quimio-radioterápico, resultando nos efeitos tardios já bem descritos para esta doença<sup>225-226</sup>.

Entretanto, com a intensidade do tratamento atual, os fatores prognósticos estão tendendo a desaparecer<sup>64</sup>. Desta forma, a procura por novos fatores prognósticos, sobretudo aqueles não relacionados apenas às características

do tumor, mas também associados às características do hospedeiro, é essencial para se determinar quais pacientes poderiam ter a intensidade do tratamento diminuída, assim como identificar um grupo de pacientes que necessitaria ter o tratamento intensificado.

Neste estudo, foi identificado que o excesso de linfócitos Granzima B+ no microambiente tumoral (variável associada ao hospedeiro) e a doença extranodal (variável associada ao tumor) possuem valor independente na predição da recaída nas crianças com LHc. O agrupamento destas variáveis num score prognóstico foi capaz de mostrar 3 grupos distintos com sobrevidas marcadamente diversas. O tamanho amostral em cada um dos grupos prognósticos obtidos confere poder estatístico aos resultados mostrados e permite que este escore seja utilizado em estudos prospectivos a fim de ser validado.

Um aspecto importante deste escore proposto é que ele está constituído por variáveis facilmente obtidas por clínicos (avaliação da doença extranodal) e patologistas (número de linfócitos Granzima B+ /mm<sup>2</sup>), tornando-o potencialmente útil nos centros de tratamento oncológico onde métodos caros de estratificação, como a da tomografia por emissão de pósitrons utilizando fluorodeoxiglicose, não estão disponíveis.

### **6.7 O Microambiente Tumoral do Linfoma de Hodgkin Clássico está Associado a Características Relativas a Funcionalidade do Ciclo Celular e Apoptose das Células Neoplásicas**

A imunohistoquímica tem sido considerada uma técnica “padrão ouro” na investigação da expressão de proteínas no LHc devido ao pequeno número de células neoplásicas presente nesta neoplasia. Apesar das linhagens celulares

provenientes das células de Hodgkin e Reed-Sternberg serem o único modelo experimental disponível atualmente, elas não representam a doença em sua totalidade, uma vez que estas células são provenientes de pacientes com estadiamento IV (infiltração neoplásica da medula óssea, líquido ascítico ou pleural), são todas EBV-negativas e, mais importante, perderam uma das principais características das células H-RS que é a sua dependência do microambiente tumoral. Estas características reforçam a necessidade de se testar as hipóteses surgidas em estudos *in vitro*, numa série uniforme de casos de LHc.

Neste estudo, foi avaliada a possibilidade de um “cross-talk” entre as células H-RS e as células do sistema imune, tendo como foco algumas características do ciclo celular das células neoplásicas. Para este estudo, foram escolhidos p21, p53, Bcl2 e Ki67 porque a imunoexpressão destas proteínas tem sido extensivamente estudada no LHc, possibilitando melhores comparações<sup>62, 68, 75-76, 83, 227</sup>, além de estarem associados a grupos de doença agressivamente distintos<sup>185</sup>.

Foi identificado pela primeira vez na literatura que o maior número de células multinucleadas (NMN) em relação às células unicleadas (NUN) pode estar influenciado pelo estatus funcional das vias de p21 e p53. Neste e em outros trabalhos foi visto que as células H-RS expressam marcadores de proliferação celular (como Ki67), porém, não há correlação entre o nível de expressão destes e o número de células tumorais<sup>62, 67</sup>, sugerindo que a indução da replicação do DNA está desacoplada da divisão celular. De fato, sabe-se que a multinucleação e poliploidia das células H-RS é devida a parada mitótica seguida por defeitos na citocinese e/ou endoreduplicação do material genético, assim como estádios mitóticos abortivos e defeitos na passagem de metáfase para anáfase<sup>70, 228-229</sup>.

Estudos de expressão gênica mostraram que o LHc é caracterizado por um aumento da expressão de genes envolvidos nos “checkpoints” G1/S e G2/M do ciclo celular, o que define “assinaturas” associadas com uma resposta desfavorável à terapia<sup>67-68</sup>.

O checkpoint mitótico é um conjunto de processos e moléculas responsáveis por: (i) o controle da entrada em mitose, após a célula replicar o seu material genético na fase S; e (ii) o controle da segregação dos cromossomos; etapa que ocorre quando o material genético e o aparelho microtubular mitótico (fuso) encontram-se íntegros. Nas células normais, alterações tanto no material genético quanto na estrutura ou funcionalidade do fuso têm como consequência o envio para a morte celular na fase G2/M ou na transição da mitose (catástrofe mitótica), evitando a proliferação de células anormais. Qualquer modificação nos pontos de controle mitótico que permita a continuação do processo pode originar uma má segregação dos cromossomos, levando à aneuploidia ou à duplicação massiva do número cromossômico o que causa a poliploidia<sup>230-231</sup>. O envolvimento de p53 no checkpoint G2/M é controverso, e no LHc ainda não existem estudos extensivos sobre este tema. Uma hipótese surgida a partir dos resultados deste trabalho é que as células neoplásicas, a despeito de realizarem uma normal duplicação do DNA, fazem uma citocinese errônea e são incapazes de sofrer apoptose, estando isto mediado, ao menos em parte pelo p53. A funcionalidade da via de p53 observada nos casos com mais células NMN do que NUN, assim como a associação entre a positividade de Bcl2 e o maior número de células NMN pode sugerir um papel diferencial do p53 neste processo.

Como um importante cofator em 30 a 80% dos casos de LHc, o EBV é extensivamente investigado em sua capacidade de influenciar o ciclo celular e a desregulação da apoptose. Os casos de LHc associados ao EBV são caracterizados

pela super expressão de STAT1 e STAT3, e baixa expressão de p52, Hdm2, p27, ciclina E, CDK6 e bcl-xl<sup>67-68</sup>. Liu et al mostraram recentemente que os casos de LHc associados ao EBV expressavam significativamente menos p21<sup>232</sup>. Entretanto, não há referência neste estudo quanto aos critérios morfológicos e imunohistoquímicos utilizados na análise. Nesta série de casos pediátricos, não foi observada qualquer associação entre a expressão de p21 e a associação das células neoplásicas com o EBV, em concordância com vários outros estudos em LH do adulto<sup>67-68, 233-234</sup>.

De maneira contrária ao esperado, neste estudo o número de células H-RS em mitose/10CGA esteve diretamente associado à expressão de p21 e a funcionalidade da via de p53 nas células H-RS não em divisão. O maior número de mitoses não esteve associado nem ao número total de células H-RS, nem ao nível de expressão de Ki67. Na maioria dos modelos celulares, p21 foi identificado como um inibidor das ciclinas dependentes de cinases (CDK), como o principal mediador do crescimento celular induzido por p53 e também como um marcador de senescência celular<sup>235</sup>. Entretanto, sabe-se que os efeitos de p21 são dependentes da concentração subcelular desta proteína, com altos níveis de p21 exercendo um efeito inibitório, enquanto que baixos níveis podem aumentar a atividade de CDK4/6<sup>235</sup>. Paradoxicamente, altos níveis de expressão de p21 foram associados a uma proteção contra a apoptose, mediada ou não por p53, em estudos in vitro e in vivo<sup>236</sup>. Estes efeitos ainda não foram bem definidos no LHc e, visto que a taxa de proliferação e apoptose são fenômenos interligados de maneira complexa no LHc, é possível que a expressão de p21 (>50%) observada nos casos com grande número de células neoplásicas em mitose não deva ser interpretada como uma relação causal unidirecional. Se p53 encontra-se envolvido em diferentes momentos do ciclo

celular, como parecem indicar os dados anteriores, as evidências de ativação da via de p53 poderiam estar indicando um engajamento na indução da apoptose nas células H-RS, em que p21 exerceria um efeito modulador, explicando a ausência de associação entre um alto número de mitoses /10CGA e um alto número de células H-RS/10CGA. De fato, dos 7/8 casos (87,5%) com positividade de p21, funcionalidade da via de p53 e >10 mitoses/10CGA, eram Bax-positivo (imunopositividade de Bax >10% das células H-RS, dado não mostrado. Vide anexo VII).

Ainda uma segunda hipótese é que ambas características (expressão de p21 e mitose) estejam reguladas por um estímulo comum, e a associação observada seja uma co-variação, por exemplo da concentração de TGF $\beta$  (principal indutor de p21 independente de p53) no microambiente (vide discussão abaixo).

No momento, não temos uma explicação definitiva para a associação entre a expressão de p21 e o IPC, tendo de relevo a questão de que os papéis de p53 e p21 no ciclo celular do LHc não estão completamente entendidos.

Neste estudo, foi visto que um grande número de linfócitos Tregs foi associado independentemente com a funcionalidade da via de p53 nas células H-RS. As células Tregs são capazes de expressar TGF $\beta$ <sup>157, 237</sup> e esta citocina tem importante ação na regulação do ciclo celular. Muitos estudos mostraram que TGF $\beta$  pode inibir a proliferação celular pela regulação de p21 e ciclina A<sup>238-239</sup>. Recentemente, foi demonstrado que a desfosforilação de p53 induzida por TGF $\beta$  está associada com a ativação de caspase 3, ativação (e deslocamento citosólico) de p21 e p27, resultando na diminuição da expressão de Cdks e ciclinas. Ainda, p53 parece mediar a apoptose induzida por TGF $\beta$ , posteriormente a via de pRb/E2F-1<sup>240</sup>. Desta forma, é possível que a funcionalidade da via de p53 (avaliada neste estudo pela

expressão combinada de p21 e p53) em parte das células H-RS seja influenciada pela células Tregs do microambiente tumoral.

Por outro lado, os casos com grande número de células Tregs estiveram também associados a positividade de Bcl2. As células Tregs secretam IL10 e esta IL é capaz de induzir a ativação de STAT3<sup>157</sup> e Bcl2<sup>121</sup>. Sabe-se que o fenótipo pró-apoptótico ou anti-apoptótico das células H-RS é secundário ao balanço entre as cascatas de sinais pró-apoptóticos e anti-apoptóticos<sup>241-242</sup> e a nossa hipótese é de que os linfócitos do microambiente tumoral devam influenciar este balanço.

Um acúmulo de células B foi também observado nos casos com a funcionalidade da via de p53. Assim como as células Tregs, os linfócitos B são capazes de secretar TGFβ<sup>243-244</sup> e talvez estes linfócitos devam exercer alguma influência na maquinaria celular das células H-RS.

Na análise por agrupamentos hierárquicos, o os casos associados ao EBV se agruparam com as variáveis associadas a um maior número de células citotóxicas e Th1, como provado nas análises estatísticas e confirmando os achados de Chetaille et al<sup>113</sup>. Este mesmo grupo de casos EBV+ se agrupou com características de funcionalidade da via de p53 e fenótipo pró-apoptótico, podendo este grupo ser o representante de uma doença menos agressiva e com melhor resposta ao tratamento<sup>62</sup>.

Ao contrário do que mostrado previamente em outro estudo com a população adulta<sup>96</sup>, e evidenciado na nossa análise por agrupamentos hierárquicos, foi observada uma associação entre grande número de linfócitos Granzima B+ e a positividade de Bcl2. Esta associação é independente do estatus do EBV e em nosso modelo, contribui para um maior número de células neoplásicas em 10CGA. Os mecanismos biológicos subjacentes a esta associação são desconhecidos.

## **6.8 As Características do Microambiente do Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico Podem ser Influenciadas pelos Polimorfismos da Região Promotora da IL10**

A IL10 é uma importante citocina pleotrópica cuja função supressora no microambiente tumoral do LHc<sup>95</sup> e reguladora do processo inflamatório<sup>118</sup> é bem estabelecida. Visto a importância dos fenômenos inflamatórios na patogênese do LHc, manifestado no seu perfil sistêmico de citocinas assim como no microambiente celular, é possível hipotetizar que diferenças genéticas na produção da IL10 possam influenciar as características histológicas e imunofenotípicas do LHc.

A interpretação dos nossos resultados neste sistema tumoral precisa ser feita baseada na relação entre o SNP e a produção da proteína IL-10. Variações de até dez vezes na produção da referida proteína foram encontradas de acordo com as variantes de alta e baixa expressão no SNP -1082<sup>135, 139, 141, 144</sup>. É provável que a indução da produção de IL10 por este SNP seja devido às diversas seqüências de ligação a fatores de transcrição localizadas no promotor da IL10. Mais precisamente, dois sítios de ligação a NF- $\kappa$ B e sítios STAT3, adjacentes ou sobrepondo-se aos sítios NF- $\kappa$ B, os quais se encontram localizados imediatamente acima do microsatélite IL10.G. e do SNP-1082, podem estar envolvidos na regulação autócrina desta interleucina<sup>132</sup>.

Apesar de algumas controvérsias na literatura em relação à expressão de IL10 de acordo com os diferentes genótipos, especialmente devido aos modelos experimentais e tipo de ativação<sup>147-149</sup>, o genótipo -1082GG é considerado na maioria dos trabalhos como de alta expressão<sup>135, 139, 142-145</sup>.

Por outro lado, as variantes polimórficas parecem afetar a expressão do mRNA de IL10 dependendo da linhagem celular analisada<sup>143, 147</sup>. O ponto relevante

nesta questão é que a regulação de IL10 apresenta diferenças com relação aos tipos celulares (células T, células B, macrófagos) e com relação aos diferentes estímulos, e que o locus em questão ou elementos em desequilíbrio de ligação com ele podem ser afetados por essas diferenças.

Apesar de não termos feito ensaios de quantificação de IL10 em relação aos polimorfismos, parece-nos mais plausível que, neste estudo, seja assumido um modelo em que o genótipo -1082GG é considerado de alta produção de IL10, -1082GA de produção intermediária e -1082AA de baixa produção<sup>144</sup>. Quanto aos haplótipos, GCC foi considerado como de alta produção, ACC de produção intermediária e ATA de baixa produção<sup>144</sup>.

Nesta série de casos, a EN grau II e a EN de alto risco estiveram associadas ao haplótipo GCC. Caracteristicamente, a EN grau II e a EN alto risco apresentam maior quantidade de esclerose e fibrose, em relação a EN grau I e de baixo risco<sup>34, 36</sup>. Resultados recentes apontam para a alta produção “crônica” da IL10 como um fator responsável diretamente pela fibrose, devido a hiperexpressão de CCR2 e seu ligante CCL2<sup>245-246</sup>, ou indiretamente através da polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 (CD163+), o qual produz grandes quantidades de TGF $\beta$ , uma citocina sabidamente fibro-esclerogênica<sup>247-248</sup>. É possível que o haplótipo de alta produção da IL10 (GCC) contribua no grau de fibrose/esclerose do microambiente tumoral, influenciando desta forma no grau e risco da EN.

A presença do padrão interfolicular esteve associada ao genótipo de alta produção de IL10 -1082GG; ressalta-se que 11/12 (91,7%) dos pacientes com este padrão possuíam o haplótipo GCC. O padrão interfolicular, como dito, é caracterizado pela presença de freqüentes folículos residuais com centros germinativos e infiltrado tumoral interfolicular ou presença de hiperplasia folicular

extensiva com infiltrado tumoral interfolicular<sup>7</sup>. Como a IL10 induz a expressão de Bcl2 nos linfócitos B do centro germinativo, além de estimular a proliferação, a diferenciação e o “switching” isotípico de imunoglobulina destas células<sup>118</sup>, é possível que a alta produção de IL10 (representada pelo genótipo -1082GG) contribua para a manutenção dos folículos com centros germinativos.

Apóia esta hipótese um trabalho recente de Calvo et al<sup>249</sup> que mostra que os níveis da proteína IL10 é maior no microambiente da hiperplasia folicular reativa do que no linfoma folicular. Como o padrão interfolicular no LHc é caracterizado pela hiperplasia folicular, um processo reacional benigno similar à hiperplasia folicular reativa estudada por Calvo et al<sup>249</sup>; associada a presença de células H-RS na região interfolicular, é provável que as altas concentrações de IL10 no microambiente seja de fato a responsável por esta característica histológica.

### **6.9 Os polimorfismos da Região Promotora de IL10 Poderiam Influenciar a Composição Linfocitária do Microambiente Tumoral no LHc Pediátrico**

Neste estudo, uma clara diferença no número de linfócitos Th2 pôde ser observada quanto à constituição genética dos pacientes. Os casos com SNPs associados à alta produção de IL10 (genótipos -1082GG e -592CC e o haplótipo GCC) estiveram associados ao menor número de linfócitos Th2. Por outro lado, os casos com SNPs associados à baixa produção de IL10 (genótipos -1082AA, -592AA e o haplótipo ATA) apresentaram maior número destes linfócitos. A IL10 é caracterizada por inibir fortemente não só a produção e a proliferação dos linfócitos T CD4+ Th1 e Th2<sup>125, 250-251</sup>, como também a produção de IL2, IFN- $\gamma$ , IL4, IL5 e TNF- $\alpha$ <sup>118, 252-253</sup>. Salienta-se que as células apresentadoras de antígenos são o principal

efetor da imuno-inibição mediada pela IL10, acarretando na parada de produção, por estas células, das citocinas do tipo Th1 (IL2 e IFN- $\gamma$ ) e Th2 (IL4 e IL5)<sup>254</sup>. Desta forma, os genótipos e haplótipo associados à alta produção de IL10 poderiam influenciar negativamente no número dos linfócitos Th2 do microambiente tumoral, conforme observado neste estudo.

Em contraste, a IL10 pode ter efeitos estimulatórios nos linfócitos T CD8+, induzindo seu recrutamento, atividade citotóxica e proliferação<sup>118, 255</sup>, o que explicaria nossos achados de maior número de linfócitos T CD8+ e citotóxicos (Tia-1+) nos casos com o genótipo -592CC (alta produção de IL10) e menor número de linfócitos T citotóxicos (Tia-1+) nos casos com haplótipo ATA (baixa produção de IL10).

Um maior número de linfócitos Tregs (FoxP3+) foi observado no microambiente de casos portadores de variantes de alta produção de IL10: -1082GG (representado pelo balanço FoxP3+/C-maf+ a favor das células Tregs) e -592CC (representado pelo maior número absoluto das células Tregs, além do balanço FoxP3+/C-maf+ a favor das células Tregs). Um maior número de células Tregs foi também observado nos casos com o haplótipo GCC (alta produção de IL10). Por outro lado, o número de células Tregs esteve diminuído nos casos com o genótipo de baixa produção de IL10: -1082AA (representado pelo balanço FoxP3+/T-bet+ a favor das células Th1, e balanço FoxP3+/C-maf+ a favor das células Th2). O haplótipo ATA (baixa produção de IL10) também esteve associado ao menor número absoluto de linfócitos Tregs, além de estar associado ao balanço FoxP3+/C-maf+ a favor das células Th2.

Além do efeito principal adscrito à posição -1082 na definição dos níveis de expressão gênica, o fato das variantes polimórficas da posição -592 envolverem

um sítio de ligação de STAT3 no promotor da IL10 poderia explicar o efeito diferencial desta posição em relação às sub-populações do microambiente, dada a importância desta molécula na biologia linfocitária e na célula tumoral<sup>256-258</sup>.

A IL10 é capaz de induzir as células dendríticas a um estado tolerogênico, levando-as a adquirir a capacidade de secretar TGF $\beta$  e IL10<sup>254</sup>. Este ambiente é propício para o desenvolvimento das células Tregs na periferia, uma vez que a presença de TGF $\beta$  é requerida para a conversão dos linfócitos T CD4+CD25- virgens em linfócitos T CD4+CD25+, através da indução de expressão de FoxP3<sup>254</sup>, um fenômeno já bem descrito na literatura<sup>259-261</sup>. As células de H-RS são capazes de secretar IL10<sup>10, 262</sup> (e como parte do “self” estão também sob efeito dos SNPs de IL10), além de poderem secretar TGF $\beta$ <sup>10</sup>, reforçando um “loop” em que altas concentrações de IL10 no microambiente podem estar associadas ao maior número de células Tregs observadas neste estudo.

Desta forma, as células neoplásicas poderiam ser as iniciadoras da cascata IL10-imuno-mediada que contribuiria para um maior número de linfócitos Tregs. Soma-se a este cenário, a capacidade das células H-RS de induzir o aumento do número de células Tregs (CD4+CD25+FoxP3+) no microambiente tumoral<sup>48, 95, 213</sup>, propiciando que mais células apresentadoras de antígeno (sobretudo as células dendríticas) sejam induzidas a um estado tolerogênico, amplificando assim a cascata IL10-imuno-mediada. A galectina 1 (Gal1), por exemplo, uma proteína ligadora de glicano super-expressa pelas células, favorece a secreção de citocinas do tipo Th2 e a expansão de células Treg<sup>56</sup>. Não se sabe ainda se alguma população das células Tregs naturais (originadas no timo) são atraídas ao microambiente tumoral pela Gal1, quais células do microambiente

tumoral são induzidas ao fenótipo regulatório (CD4+CD25+FoxP3+) e se estas células regulatórias (induzidas pela galectina) são ou não linfócitos Th3<sup>108, 254</sup>.

Apoiados nestas idéias, e como este é o primeiro trabalho na literatura a ter como hipótese que a constituição genética do indivíduo pode influenciar as características locais do tumor, e a demonstrar uma influência dos polimorfismos de IL10 na composição do microambiente tumoral no LHc, realizamos um exercício intelectual para modelar as possíveis interações celulares mediadas pela IL10 no microambiente tumoral do linfoma de Hodgkin, baseado na idéia de uma cascata cíclica imunomodulatória que culmina com o aumento do número de linfócitos Tregs e CD8+, além da diminuição do número de linfócitos Th1 e Th2 (Figura 6.1).

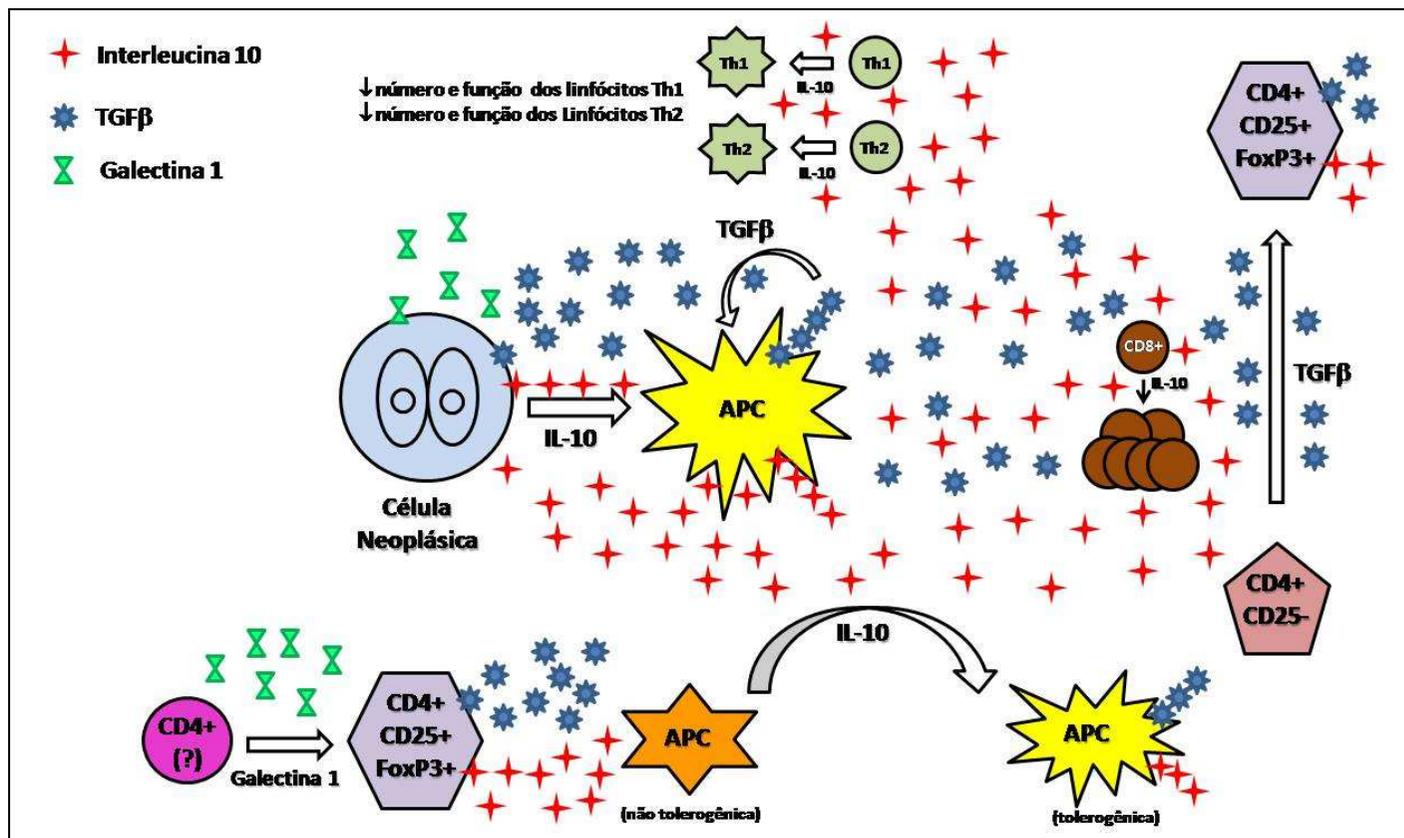


Figura 6.1: Modelo de interação entre os polimorfismos da região próxima de IL10 e os linfócitos do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico. As células neoplásicas secretariam TGFβ e IL10 (em quantidades proporcionais ao tipo SNP da região próxima de IL10). A IL10 atuaria sobre as células apresentadoras de antígenos (APC), sobretudo nas células dendríticas, levando-as a um estado tolerogênico. Neste estado, estas células secretariam IL10 (em quantidades proporcionais ao tipo de SNP da região próxima da IL10) e TGFβ (que por mecanismo autócrino induziria mais secreção de IL10). As células APC tolerogênicas perderiam a capacidade de produzir citocinas e ativar os linfócitos Th1 e Th2. A IL10 no microambiente atuaria inibindo a proliferação dos linfócitos Th1 e Th2, induziria mais células APC ao estado tolerogênico, além de induzir a proliferação dos linfócitos T CD8+. O TGFβ no microambiente tumoral induziria os linfócitos T CD4+CD25- virgens a se diferenciarem em linfócitos Tregs CD4+CD25+FoxP3. A galectina 1 secretada pelas células neoplásicas contribuiria para o aumento do número de linfócitos Tregs CD4+CD25+FoxP3, sendo desconhecido quais células seriam induzidas a este fenótipo.

## **6.10 Os polimorfismos do Gene CTLA-4 Poderiam Influenciar as Características Tumorais e do Microambiente Tumoral no Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico**

O CTLA-4 tem sido estabelecido com um importante regulador negativo da função e proliferação das células T, através de múltiplos mecanismos, como a diminuição da produção de IL2 e de seu receptor, assim como a parada das células T na fase G1 do ciclo celular<sup>263</sup>.

Está bem estabelecido que alguns polimorfismos destes genes são funcionais, modificando a capacidade de interação e/ou secreção desta proteína<sup>153</sup>. O SNP +49 A> G (rs231775) é o único polimorfismo não sinônimo de CTLA4, que causa a substituição do aminoácido 17Ala por 17Thr na seqüência líder da proteína, tendo como consequência um aumento significativo na eficiência de interação entre CTLA4 e seus receptores na variante 17Thr<sup>166</sup>. O alelo +49G, em relação ao alelo +49A, é caracterizado por ter um RNA mensageiro menos eficiente, acarretando na menor expressão da proteína CTLA-4<sup>169</sup>, enquanto o alelo CT60G é associado a menor secreção da proteína CTLA-4<sup>169</sup>. Desta forma, é possível caracterizar os alelos +49G e CT60G, os genótipos +49GG e CT60GG, e o haplótipo +49G/CT60G (Haplótipo 4 neste trabalho) como tendo baixo poder inibitório. Por outro lado, os alelos +49A e CT60A, genótipos +49AA e CT60AA, e haplótipos +49A/CT60A (Haplótipo 1) como sendo de alto poder inibitório.

O modelo comprovado na associação destas variantes com doenças autoimunes é que variantes de baixo poder inibitório estão associadas a um risco maior de desenvolver este tipo de doença, devido a sua menor capacidade de suprimir a proliferação e ativação T. Por sua vez, genótipos de alta produção de CTLA4 mostraram proteger contra doença autoimune<sup>170</sup>. A situação inversa é

proposta para o câncer, no qual os polimorfismos de alto poder inibitório influenciariam negativamente a vigilância e imunidade antitumoral<sup>136,174</sup>.

Nesta série de casos, e contrário ao modelo postulado para o papel dos polimorfismos no câncer, foi observado em termos gerais que tanto o perfil clínico-biológico quanto a resposta clínica do LHC foram associados a um modelo de imunossupressão como fator patogênico, mais similar ao observado nas doenças autoimunes.

Foi observado um maior índice de proliferação das células H-RS nos casos portadores de alelos e genótipo de baixo poder inibitório (CT60GG). Esta associação foi específica para a posição CT60G em homozigose, não sendo verificada em relação ao haplótipo 4, indicando que o efeito mediado pelo CT60G é recessivo, e pode ter relação com efeito de dose da isoforma solúvel sCTLA4 no microambiente (supressão local), menor expressão de CTLA4 pelas células Tregs (ação inibitória direta célula-célula), ou diferenças na composição do microambiente tumoral (modificação do “cross-talk” entre linfócitos do microambiente tumoral e células neoplásicas). Em qualquer dos casos, é possível que o efeito seja devido à menor inibição de uma população que controla a proliferação das células H-RS.

Em relação ao número de algumas populações T e os SNPs estudados, foi possível observar um efeito dual. Os SNPs de alto poder inibitório (representados pelo alelo CT60A e haplótipo +49A/CT60A) estiveram associados a um maior número de linfócitos T CD4+, enquanto os SNPs de baixo poder inibitório (representados pelo alelo CT60G e genótipo CT60GG) estavam relacionados ao maior número de linfócitos T CD8+ e FoxP3+.

Isto poderia apontar para diferenças no papel de CTLA4 em cada subpopulação no microambiente. Por exemplo, na população CD4+, o papel de

CTLA4 no microambiente poderia não ser tão relevante em relação à inibição da ativação e proliferação T, quanto aos efeitos na diferenciação ou polarização da resposta. De fato, uma análise mais detalhada da população T CD4+ evidenciou que o aumento do número de linfócitos T CD4+ nos portadores de SNPs de alto poder inibitório foi secundário ao aumento do número de linfócitos Th2 (C-maf+). Já o número de linfócitos Th1 (T-bet+) foi menor nos casos com os SNPs de alto poder inibitório. O CTLA4 é capaz de induzir a super expressão de indolamina 2,3-dioxigenase (IDO) pelas células apresentadoras de antígeno, uma enzima que atua na quebra do triptofano, resultando na inibição da ativação T<sup>153</sup>. Estudos têm mostrado que a expressão de IDO pelas células apresentadoras de antígeno é responsável pela diminuição no número de linfócitos Th1 e aumento no número de linfócitos Th2<sup>264-266</sup>, o que poderia explicar os resultados encontrados neste estudo.

Por sua vez, as variantes genéticas de CTLA4 de alto poder inibitório estiveram associadas a um menor número de linfócitos T CD8+, sugerindo que esta subpopulação, sua proliferação ou ativação, é alvo dos efeitos inibitórios de subpopulações que expressam CTLA4 ou sua isoforma solúvel em altos níveis<sup>153</sup>,  
169 .

A situação das células Treg infiltrantes, que expressam CTLA4 constitutivamente, e que são apontadas como as células que mediam os efeitos antitumorais no LHC em adultos, é mais complexa. Os resultados observados em estudos de correlação entre genótipos de CTLA4 e tamanho da população Treg na periferia são controversos. Um estudo prévio mostrou a associação entre o genótipo CT60AA e um número maior de linfócitos Tregs na periferia, enquanto que o número de Tregs não foi afetado pelo estatus do genótipo +49<sup>267</sup>. Por outro lado, um estudo com crianças saudáveis mostrou que o número de linfócitos Tregs na periferia foi

maior nos casos com o genótipo +49AA do que nos casos com o genótipo +49GG<sup>268</sup>. Em conjunto, estes estudos mostram que, na periferia, e em condições “homeostáticas”, os genótipos de alto poder inibitório (CT60AA e +49AA) podem influenciar no tamanho do “pool” de células Tregs.

Entretanto, os resultados de estudos funcionais a partir de sangue periférico após estimulação *ex vivo*, mostram que o número de linfócitos ativados/reguladores aumenta em amostras de indivíduos com genótipos de baixo poder inibitório<sup>153, 166</sup>.

Neste estudo, um menor número de linfócitos Tregs (FoxP3+) nos pacientes portadores de variantes CTLA4 de alto poder inibitório sugere que seria o estado de ativação das células Treg do microambiente tumoral, e sua capacidade proliferativa o que estaria sendo influenciado pelos polimorfismos de CTLA4. Assim, a influência genética na resposta ao desafio imune levaria, ao final, a diferenças no número do linfócitos Tregs. Os polimorfismos do gene CTLA4 também poderiam contribuir para esta diferença numérica influenciando os mecanismos celulares de diferenciação dos linfócitos Tregs e/ou o tamanho do “pool” de células imunes envolvidas na diferenciação dos linfócitos Tregs. Estudos analisando a relação dos polimorfismos de CTLA4 com o número e estado de ativação dos linfócitos Treg na periferia vs. o microambiente em pacientes com cânceres hematopoiéticos e não hematopoiéticos não existem até o momento e podem ser muito importantes para entender os modelos de resposta imune antitumoral nos distintos tipos de câncer, dada a importância do CTLA4 nas atuais estratégias imunoterápicas.

### **6.11 Os Polimorfismos do Gene CTLA-4 estão Relacionadas à Resposta Terapêutica no Linfoma de Hodgkin Clássico Pediátrico**

Uma melhor SLE foi observada nos casos com genótipo +49AA, de alto poder inibitório. Ao contrário, as crianças portadoras do haplótipo +49G/CT60G tiveram uma pior SLE. Estas características mantiveram significância prognóstica na regressão de Cox. Em um modelo direto de ação antitumoral das células T ativadas, seria de se esperar que um melhor prognóstico clínico estivesse determinado por variantes genéticas com maior capacidade antitumoral (baixo poder inibitório). Isto de fato foi observado em um modelo de câncer epitelial, em que o genótipo +49 AA (alto poder inibitório) foi associado a uma sobrevida mais curta ( $p= 0,003$ )<sup>269</sup>. De maneira contrária, no grupo de pacientes deste estudo, as variantes de alto e baixo poder inibitório foram correlacionadas com uma melhor e pior sobrevida, respectivamente, pondo em questão as diferenças existentes entre os tumores sólidos e os cânceres hematopoiéticos.

No microambiente dos casos de LHc pediátrico estudados aqui, as variantes de baixo poder inibitório foram correlacionadas com um maior número de linfócitos Tregs. Casos com maior número destes linfócitos, quando associados ao EBV, exibiram uma pior SLE. Ressalta-se que houve uma grande diferença na SLE em relação às variantes genéticas de CTLA4 quanto ao estatus de associação com o EBV. No grupo EBV+, tiveram melhor SLE os casos com o genótipo +49AA e haplótipo +49A/CT60A, enquanto nos casos EBV- não houve diferenças na SLE.

Estes resultados apóiam um modelo biológico no qual os linfócitos FoxP3+ poderiam estar inibindo a resposta imune direcionada contra o EBV, mostrada previamente em estudos *in vitro*<sup>212-213</sup>. Desta forma, características

genéticas que favoreceriam um menor número de linfócitos Tregs contribuiriam para uma melhor SLE, nos casos EBV+.

É importante destacar que provavelmente este modelo tem aplicabilidade nas regiões onde o EBV está associado ao percentual de casos no mínimo igual ao observado neste estudo. Talvez nos países desenvolvidos, onde os casos de LHc associados a este vírus é sabidamente menor, estes elementos que interfeririam na resposta imune dirigida contra os antígenos virais presentes na células H-RS poderiam não impactar na resposta anti-tumoral final. De fato, os estudos em adultos conduzidos nestes países mostram que os casos com mais células imunoregulatórias estão associados a melhor sobrevida<sup>10-13, 99, 207</sup>.

Este é o primeiro trabalho a explorar a relação entre os polimorfismos do gene CTLA4, características do microambiente tumoral e de resposta clínica no LHc. O que é possível dizer com os resultados obtidos é que, no LHc pediátrico, os polimorfismos de alto poder inibitório não se encontram associados a uma pior resposta antitumoral, senão que se correlacionam com características favoráveis no microambiente e na resposta terapêutica, sugerindo que os efeitos antitumorais nos casos associados ao EBV não são mediados por características supressoras das células Treg. Isto se contrapõe ao modelo atual de imunidade anti-tumoral nos cânceres não hematopoiéticos<sup>166, 169</sup> e confirma, através de uma abordagem diferente das utilizadas até o momento, baseada em metodologia genética, a natureza supressora da resposta imune contra o linfoma de Hodgkin clássico.

O papel do EBV neste cenário poderia ser o de um “lutador adaptativo”, em que, como resposta ao recrutamento de células T CD8+ antivirais para o microambiente, o vírus geraria as condições bioquímicas para recrutar ou diferenciar a população efetora da resposta imune antitumoral, células Treg. Se estas

conseguirem suprimir a resposta antiviral primária, a consequência seria de que o maior número de células Tregs, neste modelo pediátrico, estaria associado a uma pior sobrevida. Desta forma, a depender da constituição genética do indivíduo, diferentes interações genético-ambientais aconteceriam, determinando diferenças tanto no microambiente tumoral quanto na resposta imune anti-tumor e conseqüentemente, diferenças na resposta terapêutica. Cabe mencionar que a presença do EBV nas células H-RS teve um impacto positivo, porém não significativo na SLE das crianças, sugerindo que a capacidade de resposta imune contra o vírus é um balanço entre tamanho e estado funcional de duas ou mais populações (neste estudo identificadas como linfócitos T CD8+ e FoxP3+, e provavelmente também os macrófagos), influenciada possivelmente pela constituição genética do hospedeiro.

## 7- CONCLUSÕES

Este estudo incluiu todos os pacientes pediátricos (0-18 anos) com linfoma de Hodgkin diagnosticados no INCA entre 1999-2006, com material histopatológico disponível. O perfil clínico, demográfico e histológico do grupo estudado permite caracterizar a doença como afetando crianças de maior idade (adolescentes), predominantemente do subtipo histológico esclerose nodular e com curvas de sobrevida semelhantes aos observados nos estudos clínicos em países desenvolvidos.

O LHc pediátrico apresenta no Rio de Janeiro um padrão epidemiológico intermediário entre o observado nos países ricos e em desenvolvimento, caracterizado por uma tendência ao aumento do número absoluto de casos conforme a idade, em direção ao pico de adultos jovens, maior prevalência do subtipo esclerose nodular (EN). A presença do EBV (44,8%) não foi associada a nenhum grupo etário, sendo mais freqüente nos casos de CM (68,2%), porém frequentemente associado ao subtipo EN (38,85%). Este padrão é notoriamente diferente do observado em outro estudo realizado no Nordeste do Brasil..

O subtipo histológico celularidade mista foi caracterizado por um menor número de linfócitos T CD4+ /mm<sup>2</sup>, maior número de linfócitos CD20+ /mm<sup>2</sup> e razão entre linfócitos CD4+/CD20+ <1, no microambiente tumoral. Estas características permitem afirmar que a celularidade mista nas crianças com LHc não parece ser conseqüente apenas à infecção precoce pelo vírus Epstein-Barr, mas sim resultante da resposta imune deficiente frente ao desafio imunológico imposto pela combinação

“células tumorais e vírus Epstein-Barr”. Ao passo que a esclerose nodular seria a resultante de uma melhor resposta imune.

O índice de proliferação celular dos linfócitos no microambiente tumoral baseado na imunexpressão de KI67, estudado pela primeira vez neste trabalho, está relacionado ao tamanho de algumas populações linfocitárias desse microambiente e pode ter influência na resposta clínica.

Os resultados obtidos quanto às sub-populações de linfócitos presentes no microambiente tumoral sugere que o LHc pediátrico tem características particulares em relação a este microambiente, diferenciando-se do observado nos adultos, como a presença de um maior número de linfócitos CD20+ em relação à subpopulação CD4+ e uma mudança gradual do perfil celular, com diminuição do número de células CD8+, Th1, e B conforme o aumento da idade. O vírus Epstein-Barr mostrou estar associado à constituição de um microambiente característico, formado por maior número de células T CD8+, Granzima B+ e CD4+ de tipo Th1 (Tbet+).

A combinação de características clínicas (doença extranodal) e características do microambiente tumoral (número de células expressando o marcador de ativação citotóxica Granzima B) em um escore prognóstico é capaz de prever recaída nas crianças com LHc, tratadas com protocolos baseados na administração de antraciclina.

As interações observadas entre o vírus Epstein-Barr, linfócitos do microambiente tumoral, características clínicas e resposta ao tratamento, permitem afirmar que este vírus, ao contrário dos adultos, é fator prognóstico de melhor resposta terapêutica. Nos casos associados ao EBV, foi observada heterogeneidade quanto a resposta terapêutica em relação à presença de células CD8+ (melhor prognóstico) e células FoxP3+ (pior prognóstico).

Foram encontradas associações entre marcadores relacionados à proliferação e a apoptose das células H-RS e entre estas e as características do microambiente tumoral. Foi identificado pela primeira vez na literatura que o maior número de células multinucleadas (NMN) em relação às células uninucleadas (NUN) pode estar influenciado pelo estado funcional das vias de p21 e p53. Um grande número de linfócitos Tregs foi associado independentemente com a funcionalidade da via de p53 e a expressão de Bcl2 nas células H-RS, o que sugere a existência de um “cross-talk” entre as células imunes e as células H-RS.

Os polimorfismos da região promotora do gene interleucina 10, assim como os polimorfismos do gene CTLA-4 influenciaram a composição do microambiente tumoral do LHc pediátrico, em relação ao número de linfócitos T reguladores, Th2 e T CD8+. A abordagem genética contribui para firmar a natureza supressora da resposta imune anti-tumoral no LHc.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Swerdlow SH, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2008.
2. Kuppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. Oct 2003;3(10):801-812.
3. Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *Int J Cancer*. Sep 15 1971;8(2):192-201.
4. Gutensohn N, Cole P. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Semin Oncol*. Jun 1980;7(2):92-102.
5. Re D, Thomas RK, Behringer K, Diehl V. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. *Blood*. Jun 15 2005;105(12):4553-4560.
6. Armstrong AA, Alexander FE, Cartwright R, et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia*. Aug 1998;12(8):1272-1276.
7. Zhou XG, Sandvej K, Li PJ, et al. Epstein-Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV-related lymphoma. *Cancer*. Sep 15 2001;92(6):1621-1631.
8. Chabay PA, Barros MH, Hassan R, et al. Pediatric Hodgkin lymphoma in 2 South American series: a distinctive epidemiologic pattern and lack of association of Epstein-Barr virus with clinical outcome. *J Pediatr Hematol Oncol*. Apr 2008;30(4):285-291.
9. Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. Jan 2009;9(1):15-27.
10. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol*. Jul 2010;221(3):248-263.
11. Alvaro-Naranjo T, Lejeune M, Salvado-Usach MT, et al. Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leuk Lymphoma*. Nov 2005;46(11):1581-1591.
12. Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. Feb 15 2005;11(4):1467-1473.
13. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. Feb 2008;93(2):193-200.
14. Bartlett JA, Goldklang AR, Schleifer SJ, Keller SE. Immune function in healthy inner-city children. *Clin Diagn Lab Immunol*. Jul 2001;8(4):740-746.
15. Luebke RW, Chen DH, Dietert R, Yang Y, Luster MI. Immune System Maturity and Sensitivity to Chemical Exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*. 2006;69(9):811 - 825.
16. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr*. Feb 1992;120(2 Pt 1):216-222.

17. Heldrup J, Kalm O, Prellner K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. *Acta Paediatr.* Feb 1992;81(2):125-132.
18. Sharma G, Hanania NA, Shim YM. The aging immune system and its relationship to the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* Dec 1 2009;6(7):573-580.
19. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* Jul 2009;30(7):306-312.
20. Simone R, Zicca A, Saverino D. The frequency of regulatory CD3+CD8+CD28- CD25+ T lymphocytes in human peripheral blood increases with age. *J Leukoc Biol.* Dec 2008;84(6):1454-1461.
21. Horner MJ RL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2008. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2006/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/). Accessed based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009.
22. Donaldson SS, Kaplan HS. Complications of treatment of Hodgkin's disease in children. *Cancer Treat Rep.* Apr 1982;66(4):977-989.
23. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* Nov 1971;31(11):1860-1861.
24. Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Constantinou N, et al. Development and validation of a clinical prediction rule for bone marrow involvement in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood.* Mar 1 2005;105(5):1875-1880.
25. Specht L, Carde P, Mauch P, Magrini SM, Santarelli MT. Radiotherapy versus combined modality in early stages. *Ann Oncol.* Sep 1992;3 Suppl 4:77-81.
26. Punnett A, Tsang RW, Hodgson DC. Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects. *Semin Radiat Oncol.* Jan 2010;20(1):30-44.
27. Kamel OW, Chang PP, Hsu FJ, Dolezal MV, Warnke RA, van de Rijn M. Clonal VDJ recombination of the immunoglobulin heavy chain gene by PCR in classical Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol.* Oct 1995;104(4):419-423.
28. Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med.* Oct 1 1996;184(4):1495-1505.
29. Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Apr 29 2001;356(1408):461-473.
30. Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res.* Jun 1966;26(6):1063-1083.
31. Butler JJ, Pugh WC. Review of Hodgkin's disease. *Hematol Pathol.* 1993;7(2):59-77.
32. Bennett MH, Tu A, Hudson GV. Analysis of grade 1 Hodgkin's disease (Report no 6). *Clin Radiol.* Sep 1981;32(5):491-498.
33. Bennett MH, MacLennan KA, Easterling MJ, Vaughan Hudson B, Jelliffe AM, Vaughan Hudson G. The prognostic significance of cellular subtypes in nodular sclerosing Hodgkin's disease: an analysis of 271 non-laparotomised cases (BNLI report no. 22). *Clin Radiol.* Sep 1983;34(5):497-501.

34. MacLennan KA, Bennett MH, Vaughan Hudson B, Vaughan Hudson G. Diagnosis and grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 2190 patients. *Int Rev Exp Pathol.* 1992;33:27-51.
35. van Spronsen DJ, Vrints LW, Hofstra G, Crommelin MA, Coebergh JW, Breed WP. Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972-92. *Br J Haematol.* Feb 1997;96(2):322-327.
36. von Wasielewski S, Franklin J, Fischer R, et al. Nodular sclerosing Hodgkin disease: new grading predicts prognosis in intermediate and advanced stages. *Blood.* May 15 2003;101(10):4063-4069.
37. Strum SB, Rappaport H. Significance of focal involvement of lymph nodes for the diagnosis and staging of Hodgkin's disease. *Cancer.* Jun 1970;25(6):1314-1319.
38. Doggett RS, Colby TV, Dorfman RF. Interfollicular Hodgkin's disease. *Am J Surg Pathol.* Mar 1983;7(2):145-149.
39. Colby TV, Hoppe RT, Warnke RA. Hodgkin's disease: a clinicopathologic study of 659 cases. *Cancer.* May 1 1982;49(9):1848-1858.
40. Andriko JA, Aguilera NS, Nandedkar MA, Abbondanzo SL. Childhood Hodgkin's disease in the United States: an analysis of histologic subtypes and association with Epstein-Barr virus. *Mod Pathol.* Apr 1997;10(4):366-371.
41. Hsu JL, Glaser SL. Epstein-barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit Rev Oncol Hematol.* Apr 2000;34(1):27-53.
42. Harris NL. The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we learned from its pathology? *Ann Oncol.* 1998;9 Suppl 5:S45-56.
43. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE. *Fields virology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
44. Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.* May 2004;125(3):267-281.
45. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer. *Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8.* Lyon, France  
Geneva: IARC ;  
Distributed by IARC Press and by the World Health Organization; 1997.
46. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* Oct 2001;1(1):75-82.
47. Leight ER, Sugden B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol.* Mar-Apr 2000;10(2):83-100.
48. Poppema S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:231-238.
49. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, et al. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med.* Sep 2 2002;196(5):605-617.
50. Hammerschmidt W, Sugden B. Epstein-Barr virus sustains Burkitt's lymphomas and Hodgkin's disease. *Trends Mol Med.* Jul 2004;10(7):331-336.
51. Guiretti DM, Chabay PA, Valva P, et al. Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin's lymphomas. *J Med Virol.* Nov 2007;79(11):1730-1722.

52. Henle G, Henle W, Clifford P, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst.* Nov 1969;43(5):1147-1157.
53. Figueira-Silva CM, Pereira FE. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitoria, State of Espirito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* Sep-Oct 2004;37(5):409-412.
54. Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 1 1991;88(11):4766-4770.
55. Ambinder RF, Browning PJ, Lorenzana I, et al. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. *Blood.* Jan 15 1993;81(2):462-467.
56. Engel M, Essop MF, Close P, Hartley P, Pallesen G, Sinclair-Smith C. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. *J Clin Pathol.* Mar 2000;53(3):182-186.
57. Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer.* Feb 7 1997;70(4):375-382.
58. De Matteo E, Baron AV, Chabay P, Porta J, Dragosky M, Preciado MV. Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients. *Arch Pathol Lab Med.* Oct 2003;127(10):1325-1329.
59. Claviez A, Tiemann M, Luders H, et al. Impact of latent Epstein-Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* Jun 20 2005;23(18):4048-4056.
60. Araujo I, Bittencourt AL, Barbosa HS, et al. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. *Virchows Arch.* Sep 2006;449(3):315-319.
61. Hassan R, Klumb CE, Felisbino FE, et al. Clinical and demographic characteristics of Epstein-Barr virus-associated childhood Burkitt's lymphoma in Southeastern Brazil: epidemiological insights from an intermediate risk region. *Haematologica.* May 2008;93(5):780-783.
62. Barros MH, Scheliga A, De Matteo E, et al. Cell cycle characteristics and Epstein-Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients. *Leuk Lymphoma.* Aug 2010;51(8):1513-1522.
63. Specht L, Nordentoft AM, Cold S, Clausen NT, Nissen NI. Tumor burden as the most important prognostic factor in early stage Hodgkin's disease. Relations to other prognostic factors and implications for choice of treatment. *Cancer.* Apr 15 1988;61(8):1719-1727.
64. Hasenclever D. The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease. *Ann Oncol.* 2002;13 Suppl 1:75-78.
65. Tzankov A, Krugmann J, Fend F, Fischhofer M, Greil R, Dirnhofer S. Prognostic significance of CD20 expression in classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 119 cases. *Clin Cancer Res.* Apr 2003;9(4):1381-1386.
66. Zander T, Wiedenmann S, Wolf J. Prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2002;13 Suppl 1:67-74.

67. Bai M, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, et al. Cell cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas. *In Vivo*. Mar-Apr 2005;19(2):439-453.
68. Garcia JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood*. Jan 15 2003;101(2):681-689.
69. Poppema S, van den Berg A. Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Semin Cancer Biol*. Oct 2000;10(5):345-350.
70. Barros MH, Zalcborg I, Hassan R. Syncytial neoplastic cells in paediatric Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol*. Jan 2009;82(1):81-82.
71. Portlock CS, Donnelly GB, Qin J, et al. Adverse prognostic significance of CD20 positive Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin's disease. *Br J Haematol*. Jun 2004;125(6):701-708.
72. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Viviani S, et al. CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome. *J Clin Oncol*. Mar 1 2002;20(5):1278-1287.
73. Petrella T, Michiels JF, Michiels R, et al. CD 15 antigen in Hodgkin's disease. *Pathol Res Pract*. Dec 1989;185(6):886-890.
74. von Wasielewski R, Mengel M, Fischer R, et al. Classical Hodgkin's disease. Clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol*. Oct 1997;151(4):1123-1130.
75. Barros MH, Zalcborg IR, Hassan R. Prognostic impact of CD15 expression and proliferative index in the outcome of children with classical Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer*. Feb 2008;50(2):428-429; author reply 430.
76. Montalban C, Garcia JF, Abaira V, et al. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. May 1 2004;22(9):1664-1673.
77. Maggio E, van den Berg A, Diepstra A, Kluiver J, Visser L, Poppema S. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann Oncol*. 2002;13 Suppl 1:52-56.
78. Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res*. 2002;84:277-312.
79. Morente MM, Piris MA, Abaira V, et al. Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood*. Sep 15 1997;90(6):2429-2436.
80. Spector N, Milito CB, Biasoli I, Morais JC. p53 Expression as a prognostic indicator in Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. May 1 2005;23(13):3158-3159; author reply 3159-3160.
81. Sup SJ, Alemany CA, Pohlman B, et al. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol*. Jun 1 2005;23(16):3773-3779.
82. Spector N, Milito CB, Biasoli I, Luiz RR, Pulcheri W, Morais JC. The prognostic value of the expression of Bcl-2, p53 and LMP-1 in patients with Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma*. Sep 2005;46(9):1301-1306.
83. Chabay P, Pesce P, De Matteo E, Lombardi MG, Rey G, Preciado MV. No influence of bcl-2, p53, and p21waf1 protein expression on the outcome of

- pediatric Hodgkin lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. Sep 2006;28(9):552-558.
84. Smolewski P, Niewiadomska H, Blonski JZ, Robak T, Krykowski E. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53, bcl-2 or C-erb B-2 proteins on Reed-Sternberg cells: prognostic significance in Hodgkin's disease. *Neoplasma*. 1998;45(3):140-147.
  85. Brink AA, Oudejans JJ, van den Brule AJ, et al. Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance? *Mod Pathol*. Apr 1998;11(4):376-383.
  86. Smolewski P, Robak T, Krykowski E, et al. Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. *Clin Cancer Res*. Mar 2000;6(3):1150-1160.
  87. Casasnovas RO, Mounier N, Brice P, et al. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. May 1 2007;25(13):1732-1740.
  88. Salgami EV, Efsthathiou SP, Vlachakis V, Sekara EV, Syrigos KN, Roussou PP. High pretreatment interleukin-10 is an independent predictor of poor failure-free survival in patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologia (Budap)*. 2002;32(4):377-387.
  89. Sarris AH, Kliche KO, Pethambaram P, et al. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann Oncol*. Apr 1999;10(4):433-440.
  90. Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, et al. Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. Mar 2001;86(3):274-281.
  91. Samoszuk M, Nansen L. Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. *Blood*. Jan 1 1990;75(1):13-16.
  92. Glimelius I, Edstrom A, Amini RM, et al. IL-9 expression contributes to the cellular composition in Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol*. Apr 2006;76(4):278-283.
  93. Hanamoto H, Nakayama T, Miyazato H, et al. Expression of CCL28 by Reed-Sternberg cells defines a major subtype of classical Hodgkin's disease with frequent infiltration of eosinophils and/or plasma cells. *Am J Pathol*. Mar 2004;164(3):997-1006.
  94. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, et al. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood*. Sep 15 1999;94(6):2065-2071.
  95. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. Mar 1 2004;103(5):1755-1762.
  96. Alvaro T, Lejeune M, Garcia JF, et al. Tumor-infiltrated immune response correlates with alterations in the apoptotic and cell cycle pathways in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Clin Cancer Res*. Feb 1 2008;14(3):685-691.
  97. Oudejans JJ, Jiwa NM, Kummer JA, et al. Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease. *Blood*. Feb 15 1997;89(4):1376-1382.

98. Baur AS, Meuge-Moraw C, Michel G, Delacretaz F. Prognostic value of follicular dendritic cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Histopathology*. Jun 1998;32(6):512-520.
99. Schreck S, Friebel D, Buettner M, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*. Mar 2009;27(1):31-39.
100. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res*. Feb 2003;9(2):606-612.
101. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. Sep 2004;10(9):942-949.
102. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. Dec 1 2005;11(23):8326-8331.
103. Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology*. Oct 2009;137(4):1270-1279.
104. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. Feb 14 2003;299(5609):1057-1061.
105. Morgan ME, van Bilsen JH, Bakker AM, et al. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*. Jan 2005;66(1):13-20.
106. Walker MR, Kasprovicz DJ, Gersuk VH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest*. Nov 2003;112(9):1437-1443.
107. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, et al. The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest*. Nov 2005;115(11):3276-3284.
108. Jordan MA, Baxter AG. The genetics of immunoregulatory T cells. *J Autoimmun*. Nov 2008;31(3):237-244.
109. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*. Mar 2003;3(3):199-210.
110. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity\*. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:423-449.
111. Yu H, Shahsafaei A, Dorfman DM. Germinal-center T-helper-cell markers PD-1 and CXCL13 are both expressed by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. Jan 2009;131(1):33-41.
112. Yu D, Vinuesa CG. The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol*. Oct 2010;31(10):377-383.
113. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. Mar 19 2009;113(12):2765-3775.
114. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. Mar 11 2010;362(10):875-885.
115. Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honore B, Nyengaard JR, d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. Feb 2011;96(2):269-276.

116. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. Dec 1 1989;170(6):2081-2095.
117. Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. Oct 16 1997;389(6652):737-742.
118. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
119. Fassone L, Gaidano G, Ariatti C, et al. The role of cytokines in the pathogenesis and management of AIDS-related lymphomas. *Leuk Lymphoma*. Aug 2000;38(5-6):481-488.
120. Holland G, Zlotnik A. Interleukin-10 and cancer. *Cancer Invest*. 1993;11(6):751-758.
121. Rousset F, Garcia E, Defrance T, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 1 1992;89(5):1890-1893.
122. Kossakowska AE, Urbanski SJ, Edwards DR. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. Jun 1 1991;77(11):2475-2481.
123. Guede L, Mansoor A, Birkedal-Hansen B, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis. *Blood*. Mar 15 2001;97(6):1796-1802.
124. Ito I, Saeki T, Mohuiddin I, et al. Persistent transgene expression following intravenous administration of a liposomal complex: role of interleukin-10-mediated immune suppression. *Mol Ther*. Mar 2004;9(3):318-327.
125. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. May 1 2008;180(9):5771-5777.
126. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Invest*. Jan 1994;93(1):424-428.
127. Dobzhansky T. Analysis of incipient reproductive isolation within a species of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1975;72(9):3638-3641.
128. Hamajima N, Matsuo K, Saito T, et al. Gene-environment Interactions and Polymorphism Studies of Cancer Risk in the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center II (HERPACC-II). *Asian Pac J Cancer Prev*. 2001;2(2):99-107.
129. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. Feb 15 2001;409(6822):928-933.
130. Lee S, Kasif S, Weng Z, Cantor CR. Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation. *PLoS One*. 2008;3(12):e3906.
131. Zhu X, Zhang S, Kan D, Cooper R. Haplotype block definition and its application. *Pac Symp Biocomput*. 2004:152-163.
132. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*. 1997;46(2):120-128.
133. Kube D, Rieth H, Eskdale J, Kremsner PG, Gallagher G. Structural characterisation of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. *Genes Immun*. Jun 2001;2(4):181-190.

134. Lazarus R, Klimecki WT, Palmer LJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene: differences in frequencies, linkage disequilibrium patterns, and haplotypes in three United States ethnic groups. *Genomics*. Aug 2002;80(2):223-228.
135. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*. Feb 1997;24(1):1-8.
136. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, et al. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(5):R148.
137. Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 15 1991;88(4):1172-1176.
138. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. Jan 18 1997;349(9046):170-173.
139. Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Hohler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors--a twin study. *Genes Immun*. Nov 2002;3(7):407-413.
140. Eskdale J, Keijsers V, Huizinga T, Gallagher G. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun*. Nov 1999;1(2):151-155.
141. Eskdale J, McNicholl J, Wordsworth P, et al. Interleukin-10 microsatellite polymorphisms and IL-10 locus alleles in rheumatoid arthritis susceptibility. *Lancet*. Oct 17 1998;352(9136):1282-1283.
142. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun*. Feb 2000;1(3):185-190.
143. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation*. Mar 15 2003;75(5):711-717.
144. Mormann M, Rieth H, Hua TD, et al. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun*. Jun 2004;5(4):246-255.
145. Miteva L, Stanilova S. The combined effect of interleukin (IL)-10 and IL-12 polymorphisms on induced cytokine production. *Hum Immunol*. Sep 2008;69(9):562-566.
146. Visentainerl J, Lieber S, Persoli L, et al. Correlation of IL-6 and IL-10 production following bone marrow transplantation with donor cytokine gene polymorphisms *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(6):475-479.
147. Temple SE, Lim E, Cheong KY, et al. Alleles carried at positions -819 and -592 of the IL10 promoter affect transcription following stimulation of peripheral blood cells with *Streptococcus pneumoniae*. *Immunogenetics*. Dec 2003;55(9):629-632.
148. Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl*. Feb 2003;9(2):170-181.

149. Kilpinen S, Huhtala H, Hurme M. The combination of the interleukin-1alpha (IL-1alpha-889) genotype and the interleukin-10 (IL-10 ATA) haplotype is associated with increased interleukin-10 (IL-10) plasma levels in healthy individuals. *Eur Cytokine Netw.* Jan-Mar 2002;13(1):66-71.
150. Bretscher P, Cohn M. A theory of self-nonself discrimination. *Science.* Sep 11 1970;169(950):1042-1049.
151. Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. Pillars article: T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 5031-5035. *J Immunol.* Mar 1 2009;182(5):2559-2563.
152. Parry RV, Reif K, Smith G, Sansom DM, Hemmings BA, Ward SG. Ligation of the T cell co-stimulatory receptor CD28 activates the serine-threonine protein kinase protein kinase B. *Eur J Immunol.* Oct 1997;27(10):2495-2501.
153. Gough SC, Walker LS, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev.* Apr 2005;204:102-115.
154. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol.* Feb 2002;2(2):116-126.
155. Lindsten T, Lee KP, Harris ES, et al. Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells. *J Immunol.* Oct 1 1993;151(7):3489-3499.
156. Brunner-Weinzierl MC, Hoff H, Burmester GR. Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):45-54.
157. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* Jul 2008;8(7):523-532.
158. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:65-97.
159. Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) induces transforming growth factor beta (TGF-beta) production by murine CD4(+) T cells. *J Exp Med.* Nov 16 1998;188(10):1849-1857.
160. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol.* Nov 2002;3(11):1097-1101.
161. Bour-Jordan H, Grogan JL, Tang Q, Auger JA, Locksley RM, Bluestone JA. CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment. *Nat Immunol.* Feb 2003;4(2):182-188.
162. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science.* Nov 10 1995;270(5238):985-988.
163. Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* Apr 2006;18(2):206-213.
164. Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, et al. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. *Eur J Immunol.* Nov 1999;29(11):3596-3602.
165. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Sharpe AH, Gray GS, Collins M. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. *Genomics.* Sep 15 1999;60(3):341-355.

166. Sun T, Zhou Y, Yang M, et al. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. *Cancer Res.* Sep 1 2008;68(17):7025-7034.
167. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol.* Dec 1 2000;165(11):6606-6611.
168. Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics.* Apr 2002;54(1):1-8.
169. Sun T, Hu Z, Shen H, Lin D. Genetic polymorphisms in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and cancer: the dialectical nature of subtle human immune dysregulation. *Cancer Res.* Aug 1 2009;69(15):6011-6014.
170. Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* May 29 2003;423(6939):506-511.
171. Hudson LL, Rocca K, Song YW, Pandey JP. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet.* Oct 2002;111(4-5):452-455.
172. Carson KF, Wen DR, Li PX, et al. Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol.* Jul 1996;20(7):834-840.
173. Colombo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* Jan 1 2003;101(1):78-84.
174. Chilosì M, Doglioni C, Magalini A, et al. p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. *Blood.* Nov 15 1996;88(10):4012-4020.
175. Hassan R, White LR, Stefanoff CG, et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol.* 2006;1:17.
176. Stefanoff CG, Hassan R, Gonzalez AC, et al. Laboratory strategies for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in non-hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol.* Jun 2003;12(2):79-87.
177. Sambrook J, Russell DW. *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.
178. Cavet J, Middleton PG, Segall M, Noreen H, Davies SM, Dickinson AM. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood.* Dec 1 1999;94(11):3941-3946.
179. Kube D, Mormann M, Tomiuk J, et al. Simultaneous analysis of interleukin-10 gene microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in parallel with tumour necrosis factor and interferon-gamma short tandem repeats by fluorescence-based polymerase chain reaction. *Genes Immun.* Oct 2003;4(7):459-468.
180. Hoggart CJ, Clark TG, De Iorio M, Whittaker JC, Balding DJ. Genome-wide significance for dense SNP and resequencing data. *Genet Epidemiol.* Feb 2008;32(2):179-185.

181. Schellong G, Potter R, Bramswig J, et al. High cure rates and reduced long-term toxicity in pediatric Hodgkin's disease: the German-Austrian multicenter trial DAL-HD-90. The German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Study Group. *J Clin Oncol*. Dec 1999;17(12):3736-3744.
182. Fryer CJ, Hutchinson RJ, Krailo M, et al. Efficacy and toxicity of 12 courses of ABVD chemotherapy followed by low-dose regional radiation in advanced Hodgkin's disease in children: a report from the Children's Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. Dec 1990;8(12):1971-1980.
183. Mori N, Murakami YI, Shimada S, et al. TIA-1 expression in hairy cell leukemia. *Mod Pathol*. Jul 2004;17(7):840-846.
184. Klumb CE, Hassan R, De Oliveira DE, et al. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer*. Jan 1 2004;108(1):66-70.
185. Barros MH. Linfoma de Hodgkin na infância e adolescência: um estudo das características histológicas, clínicas, epidemiológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr. . *Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia- Instituto Nacional de Câncer*. 30/03/2007 2007:1-186.
186. Chang KL, Albuja PF, Chen YY, Johnson RM, Weiss LM. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood*. Jan 15 1993;81(2):496-501.
187. Armstrong AA, Alexander FE, Paes RP, et al. Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. Jun 1993;142(6):1683-1688.
188. Razzouk BI, Gan YJ, Mendonca C, et al. Epstein-Barr virus in pediatric Hodgkin disease: age and histiotype are more predictive than geographic region. *Med Pediatr Oncol*. Apr 1997;28(4):248-254.
189. Zarate-Osorno A, Roman LN, Kingma DW, Meneses-Garcia A, Jaffe ES. Hodgkin's disease in Mexico. Prevalence of Epstein-Barr virus sequences and correlations with histologic subtype. *Cancer*. Mar 15 1995;75(6):1360-1366.
190. Preciado MV, De Matteo E, Diez B, Menarguez J, Grinstein S. Presence of Epstein-Barr virus and strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin's disease. *Blood*. Nov 15 1995;86(10):3922-3929.
191. Monterroso V, Zhou Y, Koo S, Glackin C, Bujan W, Medeiros LJ. Hodgkin's disease in Costa Rica: a report of 40 cases analyzed for Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol*. May 1998;109(5):618-624.
192. Weinreb M, Day PJ, Murray PG, et al. Epstein-Barr virus (EBV) and Hodgkin's disease in children: incidence of EBV latent membrane protein in malignant cells. *J Pathol*. Dec 1992;168(4):365-369.
193. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, et al. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas. *Arch Dis Child*. Jan 1996;74(1):27-31.
194. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype. *Cancer*. May 15 1993;71(10):3124-3129.
195. Coates PJ, d'Ardenne AJ, Slavin G, Kingston JE, Malpas JS. Detection of Epstein-Barr virus in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease arising in children. *Med Pediatr Oncol*. 1993;21(1):19-23.
196. Brousset P, Rochaix P, Chittal S, Rubie H, Robert A, Delsol G. High incidence of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's disease and absence of detection in anaplastic large-cell lymphoma in children. *Histopathology*. Aug 1993;23(2):189-191.

197. Claviez A, Tiemann M, Peters J, Kreipe H, Schneppenheim R, Parwaresch R. The impact of EBV, proliferation rate, and Bcl-2 expression in Hodgkin's disease in childhood. *Ann Hematol.* Feb 1994;68(2):61-66.
198. Leoncini L, Spina D, Nyong'o A, et al. Neoplastic cells of Hodgkin's disease show differences in EBV expression between Kenya and Italy. *Int J Cancer.* Mar 15 1996;65(6):781-784.
199. Kanavaros P, Sakalidou A, Tzardi M, et al. Frequent detection of Epstein-Barr virus (EBV), EBER transcripts and latent membrane protein-1 (LMP-1) in tumor cells in Hodgkin's disease arising in childhood. *Pathol Res Pract.* Nov 1994;190(11):1026-1030.
200. Jarrett RF, Stark GL, White J, et al. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood.* Oct 1 2005;106(7):2444-2451.
201. Carvalho RP, Evans AS, Pannuti CS, Frost P, Grossman L, Jamra MA. EBV infections in brazil. III -- Infections mononucleosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Jul-Aug 1981;23(4):167-172.
202. Rappaport H, Berard CW, Butler JJ, Dorfman RF, Lukes RJ, Thomas LB. Report of the Committee on Histopathological Criteria Contributing to Staging of Hodgkin's Disease. *Cancer Res.* Nov 1971;31(11):1864-1865.
203. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with new insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma.* Jun 2009;9(3):206-216.
204. Biggar RJ, Jaffe ES, Goedert JJ, Chaturvedi A, Pfeiffer R, Engels EA. Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. *Blood.* Dec 1 2006;108(12):3786-3791.
205. Black FL, Hierholzer WJ, Pinheiro F, et al. Evidence for persistence of infectious agents in isolated human populations. *Am J Epidemiol.* Sep 1974;100(3):230-250.
206. Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* Feb 2007;7(2):139-147.
207. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol.* Dec 2007;128(6):958-965.
208. Hudnall SD, Betancourt E, Barnhart E, Patel J. Comparative flow immunophenotypic features of the inflammatory infiltrates of Hodgkin lymphoma and lymphoid hyperplasia. *Cytometry B Clin Cytom.* Jan 2008;74(1):1-8.
209. Lee WS, Park S, Lee WY, Yun SH, Chun HK. Clinical impact of tumor-infiltrating lymphocytes for survival in stage II colon cancer. *Cancer.* Jul 21 2010.
210. Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* 2010;11:19.
211. Baumforth KR, Young LS, Flavell KJ, Constandinou C, Murray PG. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol.* Dec 1999;52(6):307-322.
212. Heller KN, Arrey F, Steinherz P, et al. Patients with Epstein Barr virus-positive lymphomas have decreased CD4(+) T-cell responses to the viral nuclear antigen 1. *Int J Cancer.* Dec 15 2008;123(12):2824-2831.

213. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, et al. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 7 2007;104(32):13134-13139.
214. Marshall NA, Culligan DJ, Tighe J, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA. The relationships between Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and regulatory T cells in Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol*. Apr 2007;35(4):596-604.
215. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol*. Jul 2008;173(1):195-204.
216. Stark GL, Wood KM, Jack F, Angus B, Proctor SJ, Taylor PR. Hodgkin's disease in the elderly: a population-based study. *Br J Haematol*. Nov 2002;119(2):432-440.
217. Diepstra A, van Imhoff GW, Schaapveld M, et al. Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. *J Clin Oncol*. Aug 10 2009;27(23):3815-3821.
218. Hernandez J, Aung S, Redmond WL, Sherman LA. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med*. Sep 17 2001;194(6):707-717.
219. Parish IA, Kaech SM. Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol*. Jun 2009;21(3):291-297.
220. Boissonnas A, Scholer-Dahirel A, Simon-Blancal V, et al. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity*. Feb 26 2010;32(2):266-278.
221. Gallamini A, Fiore F, Sorasio R, Meignan M. Interim positron emission tomography scan in Hodgkin lymphoma: definitions, interpretation rules, and clinical validation. *Leuk Lymphoma*. Nov 2009;50(11):1761-1764.
222. Gallamini A, Patti C, Viviani S, et al. Early chemotherapy intensification with BEACOPP in advanced-stage Hodgkin lymphoma patients with a interim-PET positive after two ABVD courses. *Br J Haematol*. Dec 20 2010.
223. Cerci JJ, Pracchia LF, Linardi CC, et al. 18F-FDG PET after 2 cycles of ABVD predicts event-free survival in early and advanced Hodgkin lymphoma. *J Nucl Med*. Sep 2010;51(9):1337-1343.
224. Hodgson DC, Hudson MM, Constine LS. Pediatric hodgkin lymphoma: maximizing efficacy and minimizing toxicity. *Semin Radiat Oncol*. Jul 2007;17(3):230-242.
225. Morais A, Barros MH, Hassan R, Morais VL, Muniz MT. Number of involved anatomic areas as a risk predictor in pediatric Hodgkin's lymphoma: a retrospective study. *J Pediatr (Rio J)*. May-Jun 2009;85(3):236-242.
226. Diehl V, Klimm B, Re D. Hodgkin lymphoma: a curable disease: what comes next? *Eur J Haematol Suppl*. Jul 2005(66):6-13.
227. Sanchez-Aguilera A, Montalban C, de la Cueva P, et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. Jul 15 2006;108(2):662-668.
228. Kuppers R, Brauninger A, Muschen M, Distler V, Hansmann ML, Rajewsky K. Evidence that Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin disease do not represent cell fusions. *Blood*. Feb 1 2001;97(3):818-821.

229. Park IS, Kim L, Han JY, Kim JM, Chu YC, Choi SJ. Syncytial variant of nodular sclerosis Hodgkin's lymphoma assessed by fine needle aspiration cytology. *Cytopathology*. Dec 2008;19(6):394-397.
230. Kops GJ. Dividing the goods: co-ordination of chromosome biorientation and mitotic checkpoint signalling by mitotic kinases. *Biochem Soc Trans*. Oct 2009;37(Pt 5):971-975.
231. Weaver BA, Cleveland DW. Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death. *Cancer Cell*. Jul 2005;8(1):7-12.
232. Liu TY, Wu SJ, Huang MH, et al. EBV-positive Hodgkin lymphoma is associated with suppression of p21cip1/waf1 and a worse prognosis. *Mol Cancer*. 2010;9:32.
233. Kolar Z, Flavell JR, Ehrmann J, Jr., et al. Apoptosis of malignant cells in Hodgkin's disease is related to expression of the cdk inhibitor p27KIP1. *J Pathol*. Apr 2000;190(5):604-612.
234. Ohshima K, Haraoka S, Fujiki T, et al. Expressions of cyclin E, A, and B1 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: not suppressed by cyclin-dependent kinase inhibitor p21 expression. *Pathol Int*. Jun 1999;49(6):506-512.
235. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*. May 15 2005;65(10):3980-3985.
236. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther*. Jun 2002;1(8):639-649.
237. Joetham A, Takeda K, Taube C, et al. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol*. Feb 1 2007;178(3):1433-1442.
238. Sugiyama A, Nagaki M, Shidoji Y, Moriwaki H, Muto Y. Regulation of cell cycle-related genes in rat hepatocytes by transforming growth factor beta1. *Biochem Biophys Res Commun*. Sep 18 1997;238(2):539-543.
239. Miyazaki M, Ohashi R, Tsuji T, Mihara K, Gohda E, Namba M. Transforming growth factor-beta 1 stimulates or inhibits cell growth via down- or up-regulation of p21/Waf1. *Biochem Biophys Res Commun*. May 29 1998;246(3):873-880.
240. Fan G, Ma X, Wong PY, Rodrigues CM, Steer CJ. p53 dephosphorylation and p21(Cip1/Waf1) translocation correlate with caspase-3 activation in TGF-beta1-induced apoptosis of HuH-7 cells. *Apoptosis*. Mar 2004;9(2):211-221.
241. Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ*. Aug 2006;13(8):1351-1359.
242. Hemann MT, Lowe SW. The p53-Bcl-2 connection. *Cell Death Differ*. Aug 2006;13(8):1256-1259.
243. Schena M, Gaidano G, Gottardi D, et al. Molecular investigation of the cytokines produced by normal and malignant B lymphocytes. *Leukemia*. Feb 1992;6(2):120-125.
244. Kremer JP, Reisbach G, Nerl C, Dormer P. B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells express and release transforming growth factor-beta. *Br J Haematol*. Apr 1992;80(4):480-487.
245. Christmann RB, Lafyatis R. The cytokine language of monocytes and macrophages in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):146.

246. Sun L, Louie MC, Vannella KM, et al. New concepts of IL-10 induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Dec 3 2010.
247. Sulahian TH, Hogger P, Wahner AE, et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*. Sep 2000;12(9):1312-1321.
248. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R128.
249. Calvo KR, Dabir B, Kovach A, et al. IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. *Blood*. Nov 1 2008;112(9):3818-3826.
250. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med*. Oct 1 1991;174(4):915-924.
251. Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med*. Mar 17 1997;185(6):1089-1099.
252. Schandene L, Alonso-Vega C, Willems F, et al. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J Immunol*. May 1 1994;152(9):4368-4374.
253. Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K, Akdis CA. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. *Eur J Immunol*. Jun 2000;30(6):1683-1690.
254. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. Dec 2008;226:205-218.
255. Jinquan T, Larsen CG, Gesser B, Matsushima K, Thestrup-Pedersen K. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8+ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4+ T lymphocyte migration. *J Immunol*. Nov 1 1993;151(9):4545-4551.
256. Baus D, Pfitzner E. Specific function of STAT3, SOCS1, and SOCS3 in the regulation of proliferation and survival of classical Hodgkin lymphoma cells. *Int J Cancer*. Mar 15 2006;118(6):1404-1413.
257. Lamprecht B, Kreher S, Anagnostopoulos I, et al. Aberrant expression of the Th2 cytokine IL-21 in Hodgkin lymphoma cells regulates STAT3 signaling and attracts Treg cells via regulation of MIP-3alpha. *Blood*. Oct 15 2008;112(8):3339-3347.
258. Durant L, Watford WT, Ramos HL, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity*. May 28 2010;32(5):605-615.
259. Verhasselt V, Vosters O, Beuneu C, Nicaise C, Stordeur P, Goldman M. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur J Immunol*. Mar 2004;34(3):762-772.
260. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. Oct 1 2004;173(7):4433-4442.

261. Verginis P, Li HS, Carayanniotis G. Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* Jun 1 2005;174(11):7433-7439.
262. Herbst H, Foss HD, Samol J, et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood.* Apr 1 1996;87(7):2918-2929.
263. Appleman LJ, Berezovskaya A, Grass I, Boussiotis VA. CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J Immunol.* Jan 1 2000;164(1):144-151.
264. Kong QF, Sun B, Wang GY, et al. BM stromal cells ameliorate experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th cells through the secretion of IDO. *Eur J Immunol.* Mar 2009;39(3):800-809.
265. Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi LA, et al. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *J Immunol.* Dec 15 2009;183(12):7752-7760.
266. Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation.* Dec 27 2010;90(12):1312-1320.
267. Atabani SF, Thio CL, Divanovic S, et al. Association of CTLA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol.* Jul 2005;35(7):2157-2162.
268. Jonson CO, Hedman M, Karlsson Faresjo M, et al. The association of CTLA-4 and HLA class II autoimmune risk genotype with regulatory T cell marker expression in 5-year-old children. *Clin Exp Immunol.* Jul 2006;145(1):48-55.
269. Wong YK, Chang KW, Cheng CY, Liu CJ. Association of CTLA-4 gene polymorphism with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* Jan 2006;35(1):51-54.

## **9- ANEXOS**

**Anexo I:** Carta de aprovação do estudo pelo comitê de ética em pesquisa

**Anexo II:** Ficha de coleta de dados

**Anexo III:** Sumário dos protocolos de tratamento mais utilizados neste estudo

**Anexo IV:** Estudo Brasil-Alemanha

**Anexo V:** Tabelas

**Anexo VI:** Tampões, meios e soluções

**Anexo VII:** Imunoexpressão de Bax

**Anexo VIII:** Trabalhos publicados e aprovados para publicação

**Anexo IX:** Prêmios

**ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DO ESTUDO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA**



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

Ao: Dr. Mário Henrique Magalhães Barros  
Pesquisador Principal

Rio de Janeiro, 5 de setembro de 2005

Ref.: Prot. 37/05 – Prevalência do vírus Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin na infância na cidade do Rio de Janeiro

Prezado Doutor,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA após re-análise **aprovou** o Protocolo intitulado: Prevalência do vírus Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin na infância na cidade do Rio de Janeiro em 5 de setembro de 2005.

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

Atenciosamente,

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



**ANEXO III – SUMÁRIO DOS PROTOCOLOS DE TRATAMENTO MAIS  
UTILIZADOS NESTE ESTUDO**

**PROTOCOLO HD-90**

Tabela A1: Plano terapêutico proposto para pacientes com linfoma de Hodgkin do sexo feminino.

<b>ESTADIAMENTO</b>	<b>DROGAS</b>	<b>RADIOTERAPIA</b>
I, IIA	2 OPPA	25Gy em campo envolvido
IE, IIEA, IIB, IIIA	2 OPPA 2 COPP	25Gy em campo envolvido
IIEB, IIIE, IIIB, IV	2 OPPA 4 COPP	25Gy em campo envolvido

OPPA: vincristina, procarbazona, prednisona, adriplastina  
 COPP: ciclofosfamida, vincristina, procarbazona, prednisona  
 RTX: radioterapia

Tabela A2: Plano terapêutico proposto para pacientes com linfoma de Hodgkin do sexo masculino.

<b>ESTADIAMENTO</b>	<b>DROGAS</b>	<b>RADIOTERAPIA</b>
I, IIA	2 OEPA	25Gy em campo envolvido
IE, IIEA, IIB, IIIA	2 OEPA 2 COPP	25Gy em campo envolvido
IIEB, IIIE, IIIB, IV	2 OEPA 4 COPP	25Gy em campo envolvido

OEPA: vincristina, etoposide, prednisona, adriplastina  
 COPP: ciclofosfamida, vincristina, procarbazona, prednisona  
 RTX: radioterapia

**OBSERVAÇÃO:** Pacientes com doença residual após quimioterápica tiveram acréscimo na radioterapia de 10 a 15 Gy.

## PROTOCOLO ABVD

Tabela A3: Plano terapêutico proposto para pacientes com linfoma de Hodgkin.

<b>ESTADIAMENTO</b>	<b>DROGAS</b>	<b>RADIOTERAPIA</b>
I, II	3 ABVD	20 a 25Gy em campo envolvido
III, IV	12 ABVD	20 a 25Gy em campo envolvido

A: adriplastina; B: bleomicina; V: vincristina; D: DTIC.

**ANEXO IV – ESTUDO BRASIL-ALEMANHA**  
(Carta de Aceitação do Prof. Dr. Gerald Niedobitek)

Verein für Berufsgenossenschaftliche Heilbehandlung Berlin e. V.  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Charité - Universitätsmedizin Berlin



**Unfallkrankenhaus Berlin** Warener Straße 7 12683 Berlin

Mário Henrique Magalhães Barros  
Rua Redentor 156/101 Ipanema  
CEP: 22421-030  
Rio de Janeiro - RJ  
Brazil

**Institut für Pathologie**

**Direktor:**  
Prof. Dr. med. Gerald Niedobitek,  
FRCPath

FON 030.56 81-3750  
FAX 030.56 81-3753  
E-MAIL gerald.niedobitek@ukb.de

20. February 2009

**To whom it may concern**

This is to confirm that I am happy to accept Mario Barros as a PhD student in my institute. Mario contacted me by e-mail because he had read previous papers from my group on the microenvironment of Hodgkin lymphoma. The project he proposes addresses several important unresolved questions on Hodgkin lymphoma. This work will complement and extend previous and ongoing work of my group and will be carried out in collaboration with members of my group at the Friedrich-Alexander-University in Erlangen. The methods and techniques required to carry out this project are well established in my laboratory in Berlin, and we have the space to accommodate him, including laboratory and office facilities. Morphometric studies will be carried out in Erlangen under the supervision of Dr. med. Maiké Büttner. I am convinced that through the application of our technical expertise and experience in the field to the unique collection of South American paediatric Hodgkin lymphoma cases provided by Mario we will be able to make an important contribution to the understanding of the pathogenesis of Hodgkin lymphoma.

I hereby also confirm that I have read and accepted the research proposal Mario has submitted to the DAAD, and that I wholeheartedly support his application for a grant to support his studies in Germany.

Please let me know if you require any additional information.

Yours sincerely,

  
Prof. Dr. med. Gerald Niedobitek, FRCPath

Warener Straße 7 12683 Berlin  
Tel: 030/5681-0 Fax: 030/5630 1475 E-mail: [service@ukb.de](mailto:service@ukb.de) Internet: [www.ukb.de](http://www.ukb.de)  
Geschäftsführer: Prof. Dr. Ernst Haider Prof. Dr. Axel Ekkernkamp  
Amtsgericht Charlottenburg VR 12855 B  
Deutsche Bank AG BLZ: 100 700 00 Konto: 56 8120 0 Commerzbank AG BLZ: 120 400 00 Konto: 06 13 00 0

  
1997 | 2007

Capa do Projeto Submetido ao Programa de Bolsas do DAAD

(Deutscher Akademischer Austausch Dienst)

**CONTRIBUTIONS OF THE HOST AND THE NEOPLASIC CELLS IN THE  
BIOLOGY OF PEDIATRIC HODGKIN LYMPHOMA**

**Candidate:** Mário Henrique Magalhães Barros, MD, MSc

**Institution:** Instituto Nacional do Câncer (Rio de Janeiro)

**Brazilian Advisor:** Rocio Hassan, PhD

**Brazilian Co-Advisor:** Ilana Zalberg, MD, PhD

**Institution:** Instituto Nacional do Câncer (Rio de Janeiro)

**Germany Advisor:** Gerald Niedobitek, MD, PhD

**Institution:** Director of Institutes for Pathology, Sana Klinikum Lichtenberg and  
Unfallkrankenhaus (Berlin, Germany); Professor of Pathology, Institute for Pathology,  
Friedrich-Alexander-University (Erlangen, Germany)

Rio de Janeiro, February 2009.

## Carta de Aprovação da Bolsa Sanduíche

**DAAD** Deutscher Akademischer Austausch Dienst  
Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico

Escritório Regional Rio de Janeiro

Contato: Rebeca Mendonça  
Telefone: (55) 21 2553 3296  
Fax: (55) 21 2553 9261  
E-mail: rebeca@daad.org.br

Data: 5 novembro 2009

### ERKLÄRUNG

Hiermit wird bestätigt, dass Herr **Mario Henrique Magalhães Barros** ein Stipendium von CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), im Rahmen unseres Kooperationsprogramms für Promotionsstipendien, bekommen hat. Er erhält dieses Stipendium aus öffentlichen Mitteln zur wissenschaftlichen Fortbildung auf Einladung der Bundesrepublik Deutschland.

Die wissenschaftliche Fortbildung wird an der folgenden Institution ab April 2010 bei Professor Dr. med. Gerald Niedobitek durchgeführt:

Unfallkrankenhaus Berlin  
Insitut für Pathologie  
Warener Strasse 7  
D-12683 Berlin

Herr Mario Henrique Magalhães Barros erhält einem monatlichen Stipendium in Höhe von 1.100,00 EUR.

Mit freundlichen Grüßen,



Rebeca de Saules Mendonça

DAAD Aussenstelle Rio de Janeiro



## ANEXO V – TABELA DE INICIADORES

Tabela A4: Seqüências nucleotídicas dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para a determinação dos SNPs -1082 e -592 do gene de IL-10.

Iniciadores	Seqüência (5' → 3')	Função na Reação
-1082G/A		
JW –F	AGCAACACTCCTCGTCGCAAC	5` conservado
B1	CCTATCCCTACTTCCCCC	Alelo específico: G
B2	CCTATCCCTACTTCCCCT	Alelo específico: A
-592A/C		
-592	GTGACGTGGACAAATTGCCCATTC	5` conservado
-592A	ACACATCCTGTGACCCCGCCTGTA	Alelo específico: A
-592C	ACACATCCTGTGACCCCGCCTGTC	Alelo específico: C

Tabela A5: Características clínicas, histológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr ao diagnóstico e a sobrevida livre de eventos nos casos de linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	CASOS ANALISÁVEIS PARA SLE (%)	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)
<b>Idade, anos</b>			
Mediana (Variação)	14 (3-18)		
≤ 10	23/91 (25,2)	73,9	
> 10	68/91 (74,8)	77,9	0,72
<b>Gênero</b>			
Masculino	57/91 (62,6)	75,4	
Female	34/91 (37,4)	79,4	0,74
<b>Número de Sítios</b>			
Mediana (Variação)	3 (1-9)		
< 4	55/90 (61)	83,6	
≥ 4	35/90 (39)	68,6	0,071
<b>Massa Mediastinal</b>			
Sim	59/91 (64,8)	78,0	
Não	32/91 (35,2)	75,0	0,85
<b>Estadiamento</b>			
I	10/90 (11,3)	90,0	
II	44/90 (48,8)	79,5	
III	25/90 (27,7)	80,0	
IV	11/90 (12,2)	54,5	0,14
<b>Doença Extranodal</b>			
Sim	11/90 (12,3)	54,5	
Não	79/90 (87,7)	81,0	0,028
<b>Sintomas B</b>			
Sim	48/90 (53,3)	75,0	
Não	42/90 (46,7)	81,0	0,71
<b>Grupo de Risco</b>			
Favorável	47/90 (52,2)	83,0	
Desfavorável	43/90 (47,8)	72,1	0,16
<b>Leucopenia</b>			
Sim	10/90 (11,2)	50	
Não	80/90 (88,8)	80	0,034
<b>Linfopenia</b>			
Sim	23/86 (26,8)	78,3	
Não	63/86 (73,2)	77,8	0,96

Tabela A5 (continuação): Características clínicas, histológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr ao diagnóstico e a sobrevida livre de eventos nos casos de linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	CASOS ANALISÁVEIS PARA SLE (%)	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)
<b>Anemia</b>			
Sim	59/87 (67,8)	72,9	
Não	28/87 (32,2)	89,3	0,11
<b>Desidrogenase Láctica</b>			
Alta	34/81 (42)	73,5	
Normal	47/81 (58)	78,5	0,62
<b>VSH</b>			
Alto	53/66 (80,3)	77,4	
Normal	13/66 (19,7)	84,6	0,51
<b>Subtipo Histológico</b>			
Esclerose nodular	66/91 (72,5)	78,8	
Celularidade mista	18/91 (19,7)	61,1	
Depleção linfocitária	1/91 (1,4)	NA	
Rico em linfócitos	2/91 (2,1)	NA	
Inclassificável	4/91 (4,3)	NA	0,096 <sup>1</sup>
<b>Grau da Esclerose Nodular</b>			
I	37/66 (56,0)	73,0	
II	29/66 (44,0)	86,2	0,15
<b>Risco da Esclerose Nodular</b>			
Baixo risco	29/63 (46,0)	75,9	
Alto risco	34/63 (54,0)	82,4	0,46
<b>Número de Eosinófilos</b>			
Mediana (Variação)	36 (0-3600)		
< 36 /10CGA	46/91 (50,5)	76,1	
≥ 36 /10CGA	45/91 (49,5)	77,8	0,98
<b>Associação com EBV</b>			
Sim	36/88 (36,4)	86,1	
Não	52/88 (63,6)	69,2	0,082
<b>Célula H-RS CD30+</b>			
Sim	75/82 (91,4)	78,7	
Não	7/82 (8,6)	71,4	0,6
<b>Células H-RS CD20+</b>			
Sim	21/83 (25,3)	81	
Não	62/83 (74,7)	77,4	0,6

Tabela A5 (continuação): Características clínicas, histológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr ao diagnóstico e a sobrevida livre de eventos nos casos de linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	CASOS ANALISÁVEIS PARA SLE (%)	SLE (%)	ANÁLISE UNIVARIADA (P)
<b>Linfócitos CD3+</b>			
≤451/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	22/83 (26,5)	60,0	
>451/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	61/83 (73,5)	80,4	0,037
<b>Linfócitos CD4+</b>			
≤70/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	21/83 (25,3)	73,7	
>70/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	62/83 (74,7)	73,7	0,96
<b>Linfócitos FoxP3+</b>			
≤12/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	21/84 (25)	81,0	
>12/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	63/84 (75)	73,7	0,5
<b>Linfócitos C-maf+</b>			
≤20/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	19/76 (25)	66,7	
>20/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	57/76 (75)	75,0	0,47
<b>Linfócitos T-bet+</b>			
≤15/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	20/81 (24,7)	66,7	
>15/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	61/81 (75,3)	75,0	0,47
<b>Linfócitos CD8+</b>			
≤76/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	22/86 (25,6)	71,4	
>76/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	64/86 (74,4)	76,3	0,64
<b>Linfócitos Tia-1+</b>			
≤39/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	20/81 (24,7)	89,5	
>39/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	61/81 (75,3)	69,1	0,08
<b>Linfócitos Granzima B+</b>			
≤4/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	22/78 (28,3)	90,6	
>4/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	56/78 (71,7)	69,6	0,045

Tabela A5 (continuação): Características clínicas, histológicas e de associação com o vírus Epstein-Barr ao diagnóstico e a sobrevida livre de eventos nos casos de linfoma de Hodgkin clássico.

VARIÁVEL	CASOS ANALISÁVEIS		ANÁLISE UNIVARIADA (P)
		PARA SLE (%)	
<b>Linfócitos CD20+</b>			
≤79/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	21/83 (25,3)		73,7
>79/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	62/83 (74,7)		75,7
<b>Linfócitos Benignos Ki67+</b>			
≤44/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	22/85 (25,9)		86,4
>44/mm <sup>2</sup> (percentil 25)	63/85 (74,1)		69,6

<sup>1</sup>Apenas os subtipos esclerose nodular e celularidade mista foram incluídas na equação, os demais foram excluídos devido ao pequeno número de casos. SLE: sobrevida livre de eventos. VSH: velocidade de eritrossedimentação. Célula H-RS: célula de Hodgkin e Reed-Sternberg. EBV: vírus Epstein-Barr.

Tabela A6: Sumário das características imunohistoquímicas referentes à funcionalidade do ciclo celular nas células neoplásicas e seus impactos na sobrevida livre de eventos do linfoma de Hodgkin clássico.

<b>VARIÁVEL</b>	<b>CASOS ANALISÁVEIS PARA SLE</b>	<b>SLE (%)</b>	<b>ANÁLISE UNIVARIADA (P)</b>
<b>Bcl2<sup>1</sup></b>			
Positivo	39/76 (51,3)	69,2	0,36
Negativo	37/76 (48,7)	78,4	
<b>P53</b>			
Positivo	35/82 (42,7)	82,9	0,12
Negativo	47/82 (57,3)	70,2	
<b>P21</b>			
Positivo	39/77 (50,6)	76,9	0,48
Negativo	38/77 (49,4)	71,1	
<b>P53 funcional</b>			
Sim	39/77 (50,6)	76,9	0,48
Não	38/77 (49,4)	71,1	
<b>Alto IPC</b>			
Sim	48/87 (55,1)	79,2	0,73
Não	39/87 (44,9)	74,4	

<sup>1</sup>Os casos Bcl2+ pertencentes ao grupo de risco favorável exibiram pior sobrevida livre de eventos (p=0,048). SLE: sobrevida livre de eventos. IPC: índice de proliferação celular.

Tabela A7: Análise multivariada das variantes genéticas do promotor do gene IL10 associadas às características histológicas e do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin clássico pediátrico.

VARIÁVEIS	P	INTERVALO DE CONFIANÇA, 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
<b>-1082GG</b>			
Presença do padrão interfolicular	0,083	-0,03	0,4
Células NMN/NUN >1	0,1	-0,4	0,06
Baixo número de linfócitos Th2	0,086	-0,3	0,4
<b>-1082 AA</b>			
Esclerose nodular grau I	0,2	-0,1	0,4
Células NUN/NMN >1	0,9	-0,3	0,3
Alto número de linfócitos Th2	0,06	-0,003	0,0
<b>-592 CC</b>			
Maior número de linfócitos FoxP3+	0,039	-0,002	0,0
Maior número de linfócitos CD8+	0,003	-0,002	-0,001
Menor número de linfócitos C-maf+	0,012	0,0	0,003
<b>Haplótipo GCC</b>			
Esclerose nodular grau II	0,1	-0,6	0,06
Esclerose nodular baixo risco	0,9	-0,3	0,3
Baixo número de linfócitos C-maf+	0,032	0,0	0,003
<b>Haplótipo ACC</b>			
Ausência do padrão interfolicular	0,006	-0,7	-0,1
Maior número de linfócitos CD3+	0,009	-0,001	0,0
<b>Haplótipo ATA</b>			
Menor número de linfócitos CD3+	0,058	0,0	0,001
Maior número de linfócitos C-maf+	0,089	-0,002	0,0

Células NMN/NUN >1: maior número de células neoplásicas multinucleadas em relação às células neoplásicas uninucleadas. Células NUN/NMN >1: maior número de células neoplásicas uninucleadas em relação às células neoplásicas multinucleadas.

## ANEXO VI – TAMPÕES, MEIOS E SOLUÇÕES

Os tampões, meios e soluções utilizados foram preparados conforme descrito:

### **SOLUÇÃO A** (Extração de DNA de alto peso molecular)

Solução aquosa de:

Tris-HCl 1M (pH 8.0)	1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8.0)	2 ml
NaCl 5M	20 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidestilada q.s.p.	100 ml

### **PBS (10X)**

NaCl	85 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11,15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 g
H <sub>2</sub> O bidestilada q.s.p.	1000 ml

Filtrar com filtro de 0,2 $\mu$ m e esterilizar 20 minutos em autoclave a 1atm.

### **SOLUÇÃO ESTOQUE DE ACRILAMIDA (29:1)**

Acrilamida	290 g
Bis-acrilamida	10 g
H <sub>2</sub> O bidestilada q.s.p.	1000 ml

Filtrar com filtro de 0,2 $\mu$ m.

### **TAMPÃO DE AMOSTRA PARA DNA**

Solução aquosa de:

Azul de Bromofenol	0,25% (p/v)
Xileno-cianol	0,25% (p/v)
Glicerol	30% (v/v)

### **TAMPÃO TAE (50X)**

Trizma base	242 g
Acido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0.5M (pH 8.0)	100 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada q.s.p.	1000 ml

### **TRIS-HCL (1M)**

Trizma base	121,1 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	1000 ml

Ajustar o pH ao valor desejado com HCl concentrado

### **TAMPÃO NIB**

H <sub>2</sub> O bidestilada estéril	45,75 ml
KCl 1 M	2,5 ml
Tris-HCl (pH 8,0) 1 M	0,5 ml
EDTA 0,5 M	1,0 ml
Tween 20®	0,25 ml

### **TE (1X)**

Solução aquosa de:

Tris-HCl 10mM	
EDTA (pH 8,0) 1mM	
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	1000 ml

Ajustar o pH ao valor desejado com HCl concentrado

**RCBL**

NH <sub>4</sub> Cl	8.3 g
KHCO <sub>3</sub>	1.0 g
EDTA 5%	1.8 ml
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	1000 ml

**SOLUÇÃO DE ACETATO DE SÓDIO**

Acetato de sódio 3M	409 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	1000 ml
Ajustar pH a 5,2 com HCl concentrado	

**NaOH 8mM**

NaOH	320 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	1000 ml

**HEPES 1M**

Hepes	238,3 g
H <sub>2</sub> O bidestilada qsp	1000 ml
Ajustar pH a 7,5 com KOH concentrado	

**CITRATO DE SÓDIO**

Ácido cítrico diidratado	2,94 g (se for monohidratado, 2,1 g)
Água destilada	1000 ml
Ajustar pH para 6,0.	

**BSA**

Albumina	100mg
Azida Sódica	100mg
Completar com PBS 1x até 1000ml	

## ANEXO VII – IMUNOEXPRESSÃO DE BAX

O ensaio imunohistoquímico para a avaliação da imunopressão de BAX foi realizado conforme o ítem 4.9, nos 8 casos que exibiram ao mesmo tempo positividade para p21, funcionalidade da via de p53 e mais de 10 mitoses em 10CGA.

As reações foram realizadas em lâminas convencionais (e não em lâminas de TMA). Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-BAX (DakoCytomation) numa diluição de 1:150. A recuperação antigênica foi procedida em panela de pressão com tampão citrato (pH 7,6). No processo de imunodeteção foi utilizado o kit LSAB (DakoCytomation) e a diaminobenzidina (DakoCytomation).

Um caso foi considerado positivo para BAX quando mais de 10% das células de Hodgkin e Reed-Sternberg exibiram marcação de membrana e/ou citoplasmática.

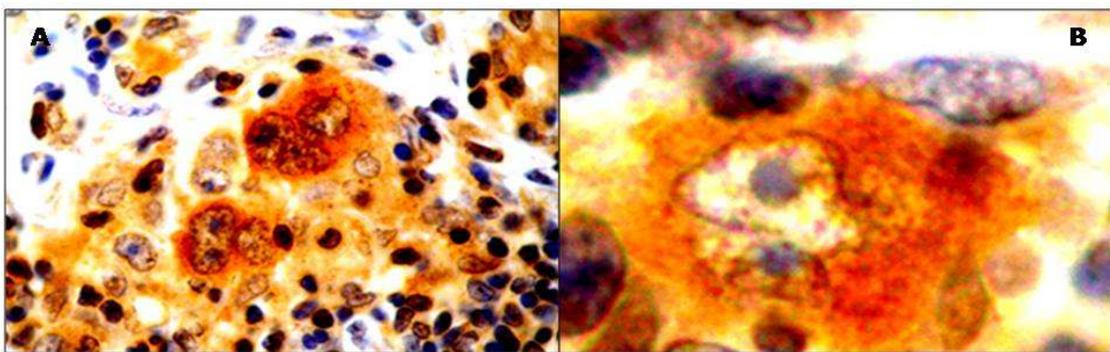


Figura A1: Células neoplásicas positivas para BAX, mostrando marcação citoplasmática. A) 400x. B) 1000x.

## **ANEXO VIII – TRABALHOS PUBLICADOS E APROVADOS PARA PUBLICAÇÃO**

LETTER TO THE EDITOR

Prognostic Impact of CD15 Expression and Proliferative Index in the Outcome of Children With Classical Hodgkin Lymphoma

To the Editor: We read with interest the article of Dinand et al. [1] about the prognostic impact of a high proliferative index (PI) and CD15 negativity in pediatric Hodgkin lymphoma (HL). The authors showed that 9.9% of their cases were CD15– negative, associated with low OS, high stages (III/IV) and lack of p53 expression, concluding that CD15 negativity in Hodgkin and Reed-Sternberg cells (H-RS) and a PI ≤ 74%, are independent unfavorable prognostic factors for overall survival (OS) and failure-free survival (FFS), respectively [1]. In adult HL, CD15 prognostic value is controversial [2–8]: Only two studies showed clinical impact [2,6], while several others did not show effect of CD15 on disease outcome (Table I). We studied 65 children (single center) with classical HL, treated with anthracyclin-based protocols. CD15 negativity was observed in 33.8% of the cases and no association with clinical presentation or survival (OS, 95% CD15+ and CD15–; FFS, 82% CD15+ vs. 80% CD15–) was found. Dinand et al. [1] also found that CD15 negativity was associated with p53 negativity (*P* = 0.009), leading them to suggest that CD15 expression would relate to H-RS cell survival and that “p53 deregulation might have a role in the loss of CD15 antigen expression.” This statement is difficult to interpret, since it is accepted that detection, and not absence of p53 immunorexpression, indicates p53 deregulation [9]. Moreover, no information on the percentage of tumor cells expressing p53 used to define positive and negative cases (cut-off), was provided; the use of different cut-off criteria is a recognized cause of the controversy about the prognostic value of p53 expression in different HL studies [10]. Therefore, although statistically consistent, the results of Dinand et al. lack a biological model supporting the clinical observations. CD15 is a group of fucosylated molecules that may function in cell adhesion and regulation of signaling cascades, pointing to an activation rather than a survival role in H-RS cells [11]. CD15 expression is variable in the different series, which may be due either to biological heterogeneity or technical issues. The contrasting results regarding CD15 prognostic value might relate to the characteristics of particular studies (patient

number, selection bias, retrospective vs. prospective, etc). However, at present, it is not possible to rule out the presence of a disease pattern characterized by a small number of CD15 negative cases associated with high clinical stages and poor prognosis, as described by Dinand et al. [1] in childhood and by von Wasielewski et al. [6] in adult HL.

The prognostic value of PI is undetermined because of differences in Ki-67 cut-off used in the different studies [3,8,12]. Dinand et al. showed good FFS in children with high PI [1]. Accordingly, we found a high FFS in children belonging to the unfavorable groups (IIB, IIB, and IV), when Ki-67 was expressed in ≥51% H-RS cells (*P* = 0.05). HL with high PI may represent a disease more responsive to chemotherapy, since drug sensitivity is proportional to the proliferating cell fraction.

The identification of prognostic factors in pediatric HL is relevant to tailor therapies for the 20–30% of patients who will relapse. We believe that further research on the prognostic role of CD15 in pediatric HL is warranted.

Mário Henrique M. Barros, MD, MSC  
 Ilana R. Zalcberg, MD, PhD  
 Rocio Hassan, PhD\*

Bone Marrow Transplantation Center (CEMO)  
 Instituto Nacional de Câncer (INCA)  
 Rio de Janeiro, Brazil

TABLE I. Prognostic Value of CD15 Expression in Hodgkin Lymphoma

References	Number of cases	CD15+ (%)	Age group	Prognostic value (multivariate analysis)
Petrella et al. [2]	108	59.0	Adults	Yes, CD15– favorable outcome
de Marcarel et al. [3]	153	—	Adults	No
Enblad et al. [4]	124	—	Adults	No
Morente et al. [5]	140	74.0	Adults	No
von Wasielewski et al. [6]	1,751	85.2	Adults	Yes, CD15– poor outcome
Vassalo et al. [7]	78	57.7	Adults	No*
Montalbán et al. [8]	259	76.4	Adults	No
Dinand et al. [1]	121	90.1	Children	Yes, CD15– poor outcome
This letter	65	66.2	Children	No

\*Significance only in the univariate analysis (*P* = 0.023).

REFERENCES

- Dinand V, Malik A, Unni R, et al. Proliferative index and CD15 expression in pediatric classical Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007; Apr 6; [Epub ahead of print]. doi: 10.1002/pbc.21204.
- Petrella T, Michiels JF, Michiels R, et al. CD15 antigen in Hodgkin’s disease. *Pathol Res Pract* 1989;185:886–890.
- de Marcarel I, Trojani M, Eghabali H, et al. Prognostic value of phenotyping by Ber-H2, Leu-M1, EMA in Hodgkin’s disease. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:953–955.
- Enblad G, Sundström C, Glimelius B. Immunohistochemical characteristics of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in relation to age and clinical outcome. *Histopathology* 1993;22:535–541.
- Morente MM, Piris M, Abreira V, et al. Adverse clinical outcome in Hodgkin’s disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood* 1997; 90:2429–2436.
- von Wasielewski R, Mengel M, Fischer R, et al. Classical Hodgkin’s disease. Clinical impact of the immunophenotype. *Am J Pathol* 1997;151:1123–1130.

\*Correspondence to: Rocio Hassan, Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Praça Cruz Vermelha 23, 6º Andar, 20230-130, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: biomol@inca.gov.br

Received 31 July 2007; Accepted 27 August 2007

7. Vassallo J, Mitze K, Traina F, et al. The prognostic relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2003;44:483–488.
8. Montalbán C, García J, Abaira V, et al. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: A study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2004;22:1664–1673.
9. Chabay P, Pesce P, De Matteo E, et al. No influence of bcl-2, p53 and p21<sup>waf1</sup> protein expression on the outcome of pediatric Hodgkin lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28:552–558.
10. Spector N, Milito CB, Biasoli I, et al. P53 expression as a prognostic indicator in Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:1301–1306.
11. Ohama-Malka O, Benharroch D, Isakov N, et al. Selectins and anti-CD15 (Lewis x/a) antibodies transmit activation signals in Hodgkin's lymphoma-derived cell lines. *Exp Hematol* 2003;1:1057–1065.
12. Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, Cueva P, et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;108:662–668.

# Pediatric Hodgkin Lymphoma in 2 South American Series: A Distinctive Epidemiologic Pattern and Lack of Association of Epstein-Barr Virus With Clinical Outcome

Paola A. Chabay, PhD,\* Mário H. M. Barros, MD,† Rocío Hassan, PhD,‡  
Elena De Matteo, MD,\* Guadalupe Rey, MD,‡ María Kadma Carrico, MD,§  
Ilana Zalberg Renault, PhD,† and María Victoria Preciado, PhD\*

**Summary:** Hodgkin lymphoma (HL) shows a bimodal distribution with a first peak in developing countries during childhood. The causative role and prognostic significance of Epstein-Barr virus (EBV) association in patients with HL is controversial. Our aim was to perform a comparative study of EBV association in 2 Latin American pediatric HL series, and to correlate it with patient's survival. Epstein-Barr encoded RNAs in situ hybridization and latent membrane protein 1 immunohistochemistry were performed on formalin-fixed, paraffin-embedded HL biopsies from 176 pediatric patients from 2 public institutions from Argentina and Southeast Brazil. Mixed cellularity subtype was prevalent in Argentine HL (Arg HL) (52%) and nodular sclerosis subtype in Brazilian HL (BR HL) (83%). EBV expression was detected in 52% of cases, namely 54% Arg HL and 48% Br HL. EBV was significantly associated with mixed cellularity subtype in both populations. In Arg HL, EBV positivity was significantly higher in patients  $\leq 10$  years ( $P = 0.0011$ ). Event-free survival did not attain statistical significance neither in Arg HL ( $P = 0.5317$ ), nor in Br HL ( $P = 0.8321$ ). Our results do not support EBV association stated for pediatric HL in developing countries. Correlation of younger age with EBV infection only in Argentine patients might be related to a different age background. In our pediatric series, EBV status cannot be used as prognostic factor.

**Key Words:** Epstein-Barr virus, Hodgkin lymphoma, pediatric, survival

(*J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:285–291)

Hodgkin lymphoma (HL) is one of the most frequent lymphomas in the Western world affecting mainly young adults.<sup>1</sup> In industrialized countries, the onset of HL shows a bimodal distribution with a first peak in young adults and a second peak after the age of 50. In developing countries, the first peak occurs predominantly during childhood and its incidence decreases with age, whereas in industrialized countries, young children are only rarely affected by HL in contrast with young adults in which incidence increases with age.<sup>2</sup> The hallmark of HL are typical, large Hodgkin and Reed Sternberg (HRS) cells, which usually represent 1% to 10% of the cellular infiltrate of affected tissues.<sup>3</sup>

It has been stated that mixed cellularity (MC) is the predominant subtype in childhood HL, which seems to be related to unfavorable socioeconomic settings,<sup>4,5</sup> whereas among young adults the most common subtype is nodular sclerosis (NS). In developed countries, a predominance of NS over MC in pediatric HL was described in some studies.<sup>4,6,7</sup> Exceptions to this pattern were also described, either describing a predominance of NS in developing regions (ie, Kenya, Costa Rica)<sup>7</sup> or of MC in developed ones (ie, France and Japan).<sup>8,9</sup>

Epidemiologic studies pointed toward a viral etiology of HL. Evidences for a causative role of Epstein-Barr virus (EBV) infection in the pathogenesis of a fraction of HL has been accumulated from numerous clinicopathologic studies during recent years.<sup>4</sup> EBV, a  $\gamma$ -herpesvirus,<sup>10</sup> infects more than 90% of adults worldwide, and it persists in B-lymphocytes as a life-long silent infection.<sup>11</sup> In underdeveloped and developing regions, primary EBV infection occurs within a few months to a few years after birth, and EBV seroconversion is almost universal by the age of 6 years. Conversely, in industrialized countries, EBV infection occurs only during the second and third decade of life.<sup>12</sup>

The prognostic significance of EBV association in patients with HL is controversial. Some of the interstudy

Received for publication March 23, 2007; accepted December 4, 2007.

From the \*Molecular Biology Laboratory, Pathology Service; ‡Oncology Service, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina; †Molecular Biology Laboratory, Bone Marrow Transplantation Centre (CEMO); and §Hematology Service, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

Supported in part by a grant from National Agency for Science and Technology Promotion (PICT no 10977, Resol no. 008/04), a CAPES/SECyT research project BR/PA-05/SV/040; Swissbridge Foundation (Switzerland) (To I.Z.R and R.H.)

Paola A. Chabay and Mário H. M. Barros contributed equally to this manuscript.

Paola A. Chabay and María Victoria Preciado are members of the National Research Council (CONICET), Research Career Programme.

Reprints: Dr Paola A. Chabay, PhD, Laboratorio de Biología Molecular, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Gallo 1330, C1425EFD, Ciudad de Buenos Aires, Argentina (e-mail: paola\_chabay@yahoo.com.ar).

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

variation may be attributable to the different epidemiologic features of the disease in different geographic settings and some may be related to case selection.<sup>13</sup> Several studies carried out in developed countries have proved that EBV presence has a beneficial effect on survival, particularly in pediatric patients.<sup>13-18</sup> Conversely, other studies have reported no significant differences in survival by EBV status in adult<sup>13,19</sup> and pediatric HL patients<sup>4</sup> in developed countries, and have even observed a poorer survival in older patients.<sup>13,14</sup> In developing countries, there has been very little research on the effect of EBV status on survival in pediatric HL.<sup>20</sup>

Our aim was to perform a comparative study of EBV expression in 2 different Latin American pediatric HL series, from Argentina and Southeastern Brazil, and correlate these findings with histologic distribution and patient's survival.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and Tissue Preparation

Formalin-fixed, paraffin-embedded HL tissue samples from 176 pediatric patients (0 to 18 y) were collected retrospectively from the archives at 2 different institutions: Ricardo Gutiérrez Children's Hospital in Buenos Aires, Argentina, from 1990 to 2005 (N = 111), and the National Cancer Institute in Rio de Janeiro, Brazil, from 1998 to 2003 (N = 65). Institutional guidelines from both centers regarding human experimental investigation were followed.

Diagnosis was made from biopsies taken from the primary tumor. Histologic classification followed the World Health Organization schemes for HL.<sup>21</sup> HL types included 66 MC, 90 NS, 7 lymphocyte depletion, and 10 lymphocyte rich classic HL, and 3 nodular lymphocyte-predominant type. Cases were histologically assessed by 2 pathologists (E.D.M. and M.H.M.B.).

The median age of Argentine patients was 8 years (range, 2 to 18 y), with a male:female ratio of 2.4:1. The median age of Brazilian patients was 14 years (range, 3 to 18 y), with a male:female ratio of 1.3:1. Follow-up period ranged from 3 to 76 months (median, 38 mo) in Brazilian HL and 5 to 201 months (median, 76 mo) in Argentine HL.

### Epstein-Barr Encoded RNAs In Situ Hybridization

Epstein-Barr encoded RNAs (EBERs) in situ hybridization (ISH) was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using fluorescein isothiocyanate-conjugated EBERs oligonucleotides as probes. A monoclonal antibody (MAb) anti-fluorescein isothiocyanate labeled with alkaline phosphatase was used for detection of hybridized sites (Dako, Carpinteria). We used a well-known MC HL with specific staining in HRS cells as a positive control.

### Latent Membrane Protein 1 Immunohistochemical Staining

Immunostaining was used to localize latent membrane protein 1 (LMP1) expression in tumor cells on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections using MAbs CS1-4 (Dako) and antigen unmasking by microwave treatment with citrate 0.05 M pH 6. Immunohistochemical detection of MAbs was performed using a streptavidin-biotin complex-peroxidase detection system (LSAB, Dako) according to the manufacturer's instructions. Positive control was the same used in EBERs ISH.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 4 software. Event-free survival (EFS) was defined as the time from initiation of treatment to the event. An event in EFS was failure to achieve complete remission, relapse after a prior complete remission, or death from any cause.

Survival distributions were estimated according to the Kaplan-Meier method.<sup>22</sup> Differences in survival distributions were tested with the log-rank test.<sup>23</sup> For the univariate analysis, Fisher exact test or  $\chi^2$  test was used to assess the association between categorical variables when appropriate. All tests were 2-tailed, and a *P* value lower than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

We observed differences in the histologic distribution between Argentine HL (Arg HL) and Brazilian HL (Br HL) patients. Although MC subtype was prevalent among Arg HL (58/111, 52%), NS subtype prevailed in Br HL (54/65, 83%), the difference being statistically significant ( $P < 0.0001$ ,  $\chi^2$  test). Patients' clinical and demographic characteristics are shown in Table 1.

EBV expression in both groups of patients is summarized in Table 2. Latent EBV infection of HRS cells, as determined by EBERs ISH and LMP1 immunohistochemistry was detected in 91/176 (52%) of the HL cases. EBERs positive staining (Fig. 1A) restricted to nuclei of HRS cells and LMP1 expression (Fig. 1B) in cytoplasm membrane were detected in 54% (60/111) in Arg HL. Conversely, in Br HL, expression of EBERs was observed in a lower number of cases than LMP1 expression, 35% (23/65) versus 48% (31/65), respectively. Seven NS and 1 MC EBERs negative/LMP1 positive cases accounted for this difference. Presence of EBV was confirmed by polymerase chain reaction in all these 7 cases (data not shown). Br HL cases were considered EBV-associated when EBV was detected by 2 of the above-mentioned methods (EBERs ISH, LMP1-IHC, and polymerase chain reaction).

EBV was significantly associated with MC subtype ( $P < 0.0001$ ,  $\chi^2$  test), because most Arg HL and Br HL EBV-positive cases were MC (43/58, 74% Arg HL vs. 7/8, 87% Br HL).

**TABLE 1.** Demographic and Clinical Characteristics of Argentine and Brazilian Children With HL

	Arg HL (N = 111)	Br HL (N = 65)
Age (y), median, range	8, 2-18	14, 3-18
≤ 10 y	63 (57%)	16 (25%)
> 10 y	48 (43%)	49 (75%)
Sex		
Male	33	36
Female	78	29
Ann arbor stage		
Early (I/II)	63 (57%)	35 (54%)
Advanced (III/IV)	48 (43%)	30 (46%)
Histologic subtype		
Classic HL		
MC	58 (52%)	8 (12%)
NS	36 (32%)	54 (83%)
LD	4 (4%)	3 (5%)
LRCHL	10 (9%)	0
Nodular lymphocyte-predominant HL	3 (3%)	0
EBV association*	60/111 (54%)	31/65 (48%)

\*Includes EBER and LMP1 expression.

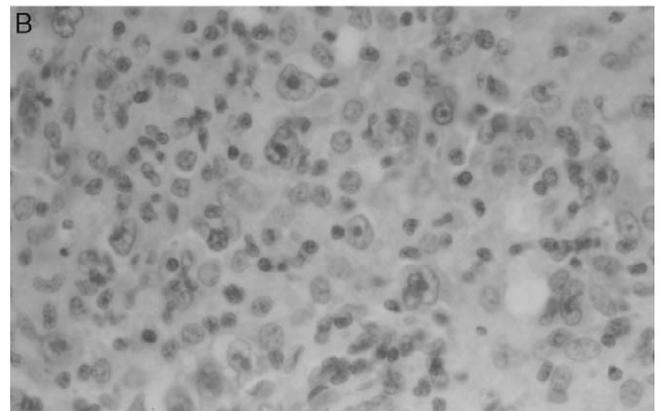
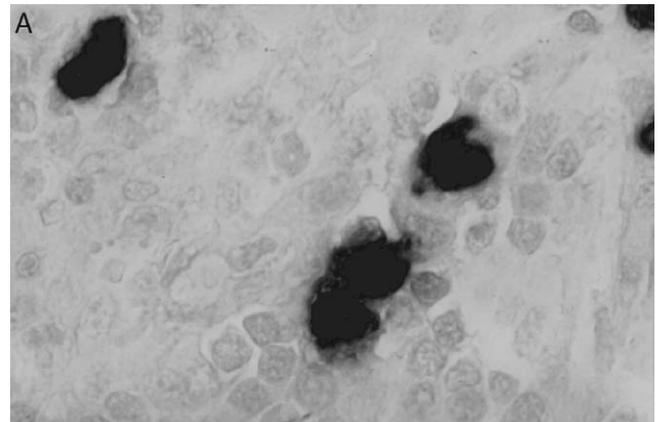
LD indicates lymphocyte depletion; LRCHL, lymphocyte rich classic HL.

As primary EBV infection occurs mainly in early childhood in both countries, EBV presence in HL biopsies was analyzed separately in 2 pediatric groups: younger than 10 years ( $\leq 10$ ) and 11 to 18 years ( $> 10$ ). The age distribution of Arg and Br HL showed that 57% and 25% of the patients were younger than 10 years, respectively. In Arg HL, the frequency of EBV positivity was significantly higher in HL patients  $\leq 10$  years than of patients  $> 10$  years ( $P = 0.0011$ , Fisher exact test). Conversely, in Br HL EBV, association with HL in younger patients was not statistically significant ( $P = 0.2498$ , Fisher exact test).

**TABLE 2.** Association of HL Subtypes With EBERs and LMP1 Expression

	HL Subtype	EBERs/LMP1	
		N/Total	%
Argentina			
Classic HL	MC	43/58	74
	NS	11/36	30
	LRCHL	3/10	30
	LD	3/4	75
Nodular lymphocyte-predominant HL	NLP	0/3	0
Subtotal		60/111	54
Brazil			
Classic HL	MC	7/8	87
	NS	23/54	42
	LRCHL	0/0	0
	LD	1/3	33
Nodular lymphocyte-predominant HL	NLP	0/0	0
Subtotal		31/65	48
Total		91/176	52

LD indicates lymphocyte depletion; LRCHL, lymphocyte rich classic HL.



**FIGURE 1.** A, EBERs ISH. A lymph node biopsy section of MC HL shows nuclear membrane and nucleus labeling of a RS cell, original magnification  $\times 100$ . B, LMP1 immunohistochemistry. A lymph node biopsy section of MC HL shows cytoplasmic and membranous labelling of RS cells, original magnification  $\times 40$ .

In HL, males (M) are affected slightly more often than females (F) among all subtypes.<sup>2</sup> Sex ratio (M:F) in Arg HL was twice as high as in Br HL. As a consequence, EBV infection was significantly more frequent in Arg HL boys than in girls, because 48 out of 77 boys were EBV positive versus 11 out of 33 EBV-positive girls ( $P = 0.0047$ , Fisher exact test). This was not observed in Br HL cases.

There was no significant association between EBV status and disease stage in Arg HL ( $P = 0.7906$ ,  $\chi^2$  test) and Br HL ( $P = 0.2155$ ,  $\chi^2$  test). EBV expression according to clinical stage is summarized in Table 3.

Concerning patients' outcome, the estimated 5-year EFS in Arg HL was 69% and in Br HL was 76%. Survival analysis related to clinical stage indicated that even though there was a trend in stage I/II patients to have better EFS, this difference was neither statistically significant in Arg HL ( $P = 0.3369$ , log-rank test) (Fig. 2A), nor in Br HL ( $P = 0.1096$ , log-rank test) (Fig. 2B).

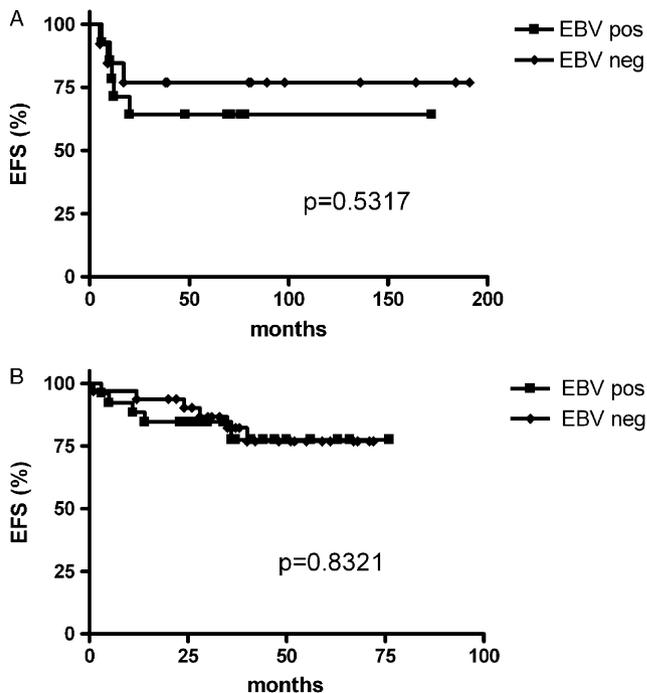
In Arg HL, the 5-year EFS for EBV-negative-associated patients was 64% compared with 77% for the EBV-negative patients. However, EFS during the follow-up period did not attain statistical significance.

**TABLE 3.** Correlation of HL Clinical Stage With EBERS and LMP1 Expression

Clinical Stage	EBERS/LMP1	
	N/Total	%
Argentina		
I/II	35/63	56
III/IV	25/48	52
Subtotal	60/111	54
Brazil		
I/II	17/35	49
III/IV	14/30	47
Subtotal	31/65	48
Total	91/176	52

( $P = 0.5317$ , log-rank test) (Fig. 3A). On the other hand, Br HL EBV-positive patients did not have improved survival compared with EBV-negative patients (5-year EFS 76% EBV positive vs. 77% EBV negative). Survival analysis did not show significant differences ( $P = 0.8321$ , log-rank test) (Fig. 3B).

We analyzed Kaplan-Meier survival curves separately in the 2 major histologic subtypes, MC and NS, in both populations. The EBV status had no significant influence on prognosis in Arg and Br HL patients according to their histologic subtype. However, we observed a trend in EBV-positive CM Arg HL patients



**FIGURE 3.** Kaplan-Meier analysis. Patients' EFS curves correlated with EBV expression in (A) Arg HL and (B) Br HL.

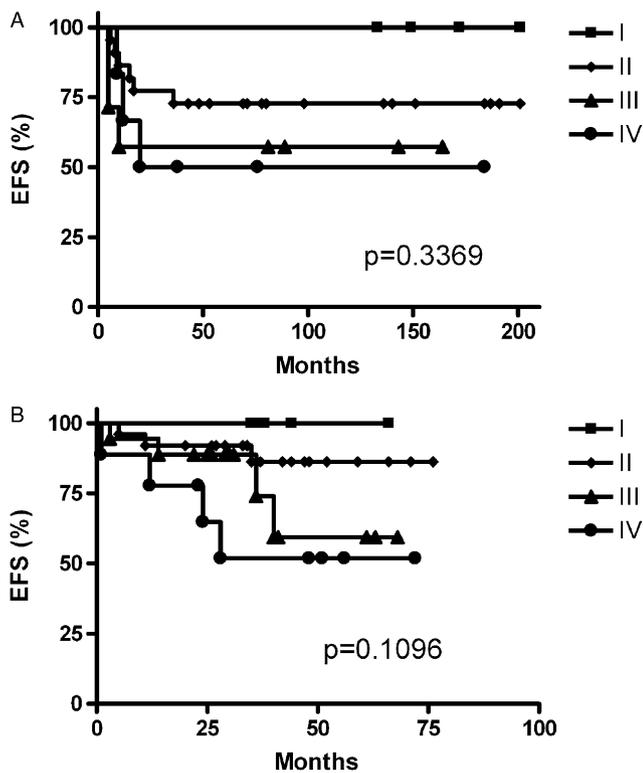
to have better EFS than EBV-negative patients, but this difference was not statistically significant ( $P = 0.1257$ , log-rank test).

**DISCUSSION**

Differences in age, sex, and subtype distribution in HL have been largely described in different populations from developed, transitional, and underdeveloped countries. As previously described by Harris,<sup>5</sup> there are 3 epidemiologic patterns of HL according to the level of socioeconomic development. In pattern I, seen in underdeveloped countries, HL incidence shows an early childhood peak, and the predominant HL subtype is MC. Pattern II, observed in developing or transitional economies, displays both childhood and second decade peaks, and equal frequency of MC and NS subtypes. Finally, in pattern III, observed in developed countries, HL shows a third decade peak and a predominance of NS over other subtypes.

In Argentina, we had previously reported an epidemiologic pattern II,<sup>24</sup> where MC subtype was mostly distributed in pediatric patients, which we reconfirmed in this study. This, however, was not the observed pattern in the Brazilian pediatric group. Brazil is a large country (+5 degrees 17' to -33 degrees 45' latitude and -34 degrees 48' to -73 degrees 60' longitude) with a marked heterogeneity regarding socioeconomic development among its different regions.<sup>25</sup> In line with this, different HL epidemiologic patterns have been described related to distinct sociogeographic populations.

Araujo et al<sup>26</sup> described a series of pediatric HL from the State of Bahia (Northeastern Brazil) with a



**FIGURE 2.** Kaplan-Meier analysis. Patients' EFS curves correlated with clinical stage in (A) Arg HL and (B) Br HL.

marked predominance of MC subtype, compatible with pattern I. Elgui de Oliveira et al<sup>27</sup> described prevalence of MC subtype in pediatric and adult patients from an unfavorable socioeconomic geographic region of the North of Brazil (pattern I) and equal distribution of NS and MC subtypes in the Southeast region of Brazil (pattern II), the latter subtype being prevalent in pediatric patients. Conversely, in a large series from Brazil's richest state (São Paulo), Vasallo et al<sup>28</sup> found approximately 70% of the patients with NS, a picture comparable with the situation in industrialized countries (pattern III). In our analysis, in a pediatric HL group from the Southeast region of Brazil (Rio de Janeiro), we observed a net predominance of NS over other subtypes. In a study of a series of 65 HL cases (age 11 to 84 y) from the same state, Loureiro et al<sup>29</sup> found a comparable subtype distribution, suggesting that this is the predominant pattern in the Southeast region of Brazil, which enjoys a better socioeconomic condition than the Northeast part of the country.<sup>25</sup>

With the aim to better understand these differences between Argentine and Brazilian childhood HL, we performed LMP1 immunolocalization and EBERs ISH to identify cases in which EBV was exclusively expressed in malignant cells. This is normally related to a direct role of the virus in the neoplastic process.

Armstrong et al<sup>30</sup> have built a 3-disease model for Hodgkin disease, on the basis of age at diagnosis and EBV status. The first entity is largely a disease of childhood, EBV-associated, with higher incidence in developing countries and usually of MC subtype. Development of Hodgkin disease is probably associated with an early exposure to EBV infection, which occurs at a particularly young age in less economically developed countries. The second entity, predominantly affecting older adults, is also EBV-associated, usually of MC subtype, and likely to be related to EBV reactivation events. The third entity predominantly affects young adults. It is more prevalent in developed countries, usually of NS subtype, and not EBV-associated.

In developed populations, HRS cells are infected by EBV in about 40% of cases of classic HL.<sup>1</sup> On the other hand, a very high association of EBV with pediatric HL from Latin America has been reported, where nearly all cases are EBV positive.<sup>10</sup> Our results from 2 Latin American pediatric populations neither support this observation nor strengthen Armstrong first entity for developing countries, because we have found an EBV expression of 54% and 48% in Arg and Southeastern Br HL, respectively.

In Argentina, our previous studies on EBV epidemiology in pediatric HL disclosed an association frequency similar to those observed in developed countries.<sup>24,31</sup> In Brazil, there are 2 quite different scenarios, occurring in the Northeast and the Southeast regions of the country, respectively. In Northeastern Brazil, Araujo et al<sup>26</sup> found 87% of EBV-positive HL pediatric cases. Conversely, in the Southeast region, our

48% of EBV association with HL was slightly lower than the 55% of another study, including young and adult patients from Rio de Janeiro<sup>29</sup> and also lower than the 64% found in Sao Paulo in adult patients.<sup>32</sup>

In Burkitt lymphoma (BL), the other EBV-associated childhood lymphoma, EBV expression is different between both countries: while in Argentina, a very low EBV association in immunocompetent patients (approximately 10%) is compatible with a sporadic epidemiologic pattern,<sup>33</sup> in Brazil the existence of a geographical gradient has been suggested. A high EBV frequency in the Northeastern part of the country (> 80%) was reported, whereas intermediate frequencies (~60%) were found in the Southeast region, including Rio de Janeiro.<sup>34</sup> Contrasting with HL, in Rio de Janeiro EBV-positive BL is a disease of early childhood (4 to 5 y) and has been suggested that early primoinfection could play a pathogenic role (Hassan et al, unpublished data). The fact that EBV-positive HL children herein described were older than BL from the same Brazilian institution could reflect a distinct interplay of EBV with the immune system in the 2 diseases.

As primary infection seems to occur in early childhood in Argentina and Southeastern Brazil,<sup>35,36</sup> the correlation of younger age with EBV infection in HL only in Argentine patients ( $P = 0.0011$ , Fisher exact test), and not in Brazilian ones ( $P = 0.2498$ , Fisher exact test) might be related to a different age background of both groups reflecting distinct pathogenic factors, other than EBV seroconversion age.

In Western countries, EBV-positive cases in NS subtype accounts for 15% to 30% of cases, and MC subtype harbors EBV DNA in up to 70% of cases.<sup>2</sup> In our analysis, we confirmed that MC subtype was strongly associated with high rates of EBV positivity, 74% and 75% in Arg and Br HL, respectively ( $P < 0.0001$ ,  $\chi^2$  test). We observed in both populations that MC subtype was significantly associated with the group of patients under 10 years ( $P = 0.0014$  Arg HL,  $P = 0.0002$  Br HL, Fisher exact test). However, although MC subtype was predominant in Arg HL in all age groups, NS subtype prevailed in Br HL patients. Recent studies showed that the development of histologic subtype is related to the characteristics of cytokines produced by HRS cells.<sup>37</sup> Perhaps the genetic background (ie, promoter polymorphisms of critical cytokines) interacting with the EBV and an immature immune system might influence the different histologic subtype development of EBV-positive and EBV-negative HL in different populations.

Keegan et al<sup>14</sup> have shown that EBV-positive children were less likely than EBV-negative patients to have stage IV disease. By contrast, neither Engel et al<sup>38</sup> in 47 South African childhood HL nor Claviez et al<sup>4</sup> in a larger group of patients have observed differences between EBV expression and stage. Our findings corroborate this latter conclusion, because we did not find a significant correlation between EBV latent expression and clinical stage.

Different studies analyzing EBV association on outcome in adult HL patients have demonstrated conflicting results. In pediatric HL, this question has been less described. Engel et al<sup>38</sup> have established a significantly longer median survival in EBV-positive pediatric HL. Keegan et al<sup>14</sup> showed that EBV-positive status was associated with a more favorable survival than EBV-negative status in a small subgroup of children, postulating that EBV might serve as a useful indicator of prognosis. Claviez et al,<sup>4</sup> in contrast, reported that latent EBV expression has no influence on failure-free survival.

Our results are in agreement with those obtained by Claviez et al,<sup>4</sup> in the sense that EBV did not confer a survival advantage in pediatric HL. In fact, neither in Brazilian nor in Arg HL cases, EBV status was associated to patients' outcome ( $P = 0.8321$  and  $0.5317$ , log-rank test, respectively).

In summary, our findings give further support the fact that HL is a heterogeneous disease and that the epidemiologic models proposed in the last decade need to be refined to include new and contrasting evidences. They also suggest that EBV could be involved in complex ways in the pathogenesis of classic HL in children, not only dependent on early EBV infection. In our pediatric HL series, EBV status cannot be used as a prognostic factor. It would be interesting to study also genetic instability and/or mitotic check point abnormalities in HRS cells<sup>39,40</sup> to identify prognostic factors involved in the outcome of our HL patients.

## REFERENCES

- Braüninger A, Schmitz R, Bechtel D, et al. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2006;118:1853–1861.
- Thomas R, Re D, Zander T, et al. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2002;13(suppl 4):147–152.
- Küppers R, Yahalom J, Josting A. Advances in biology, diagnostics, and treatment of Hodgkin's disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2006;12(1 suppl 1):66–76.
- Claviez A, Tiemann M, Lüders H, et al. Impact of latent Epstein Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:4048–4056.
- Harris N. The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we learned from its pathology? *Ann Oncol*. 1998;9: S45–S56.
- Ambinder R, Browning P, Lorenzana I, et al. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. *Blood*. 1993;81:462–467.
- Weinreb M, Day P, Niggli F, et al. The consistent association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. *Blood*. 1996;87:3828–3836.
- Brousset P, Rochemaix P, Chittal S, et al. High incidence of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's disease and absence of detection in anaplastic large-cell lymphoma in children. *Histopathology*. 1993;23:189–191.
- Kusuda M, Toriyama K, Kamidigo NO, et al. A comparison of epidemiologic, histologic, and virologic studies on Hodgkin's disease in western Kenya and Nagasaki, Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59:801–807.
- Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein Barr virus. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:801–812.
- Macswain K, Crawford D. Epstein Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:131–140.
- Dinand A, Arya V. Epidemiology of childhood Hodgkin's disease: is it different in developing countries? *Indian Pediatr*. 2006;43:141–147.
- Jarrett R, Stark G, White J, et al. Impact of tumor Epstein Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population based study. *Blood*. 2005;106:2444–2451.
- Keegan T, Glaser S, Clarke C, et al. Epstein Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population based study. *J Clin Oncol*. 2005;23:7604–7613.
- Krugmann J, Tzankov A, Gschwendtner A, et al. Longer failure-free survival interval of Epstein-Barr virus-associated classical Hodgkin's lymphoma: a single-institution study. *Mod Pathol*. 2003;16:566–573.
- Montalbán C, Abaira V, Morente M, et al. Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression has a favorable influence in the outcome of patients with Hodgkin's disease treated with chemotherapy. *Leuk Lymphoma*. 2000;39:563–572.
- Murray P, Billingham L, Hassan H, et al. Effect of Epstein-Barr virus infection on response to chemotherapy and survival in Hodgkin's disease. *Blood*. 1999;94:442–447.
- Morente M, Piris M, Abaira V, et al. Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood*. 1997;90:2429–2436.
- Flavell K, Billingham L, Biddulph J, et al. The effect of Epstein-Barr virus status on outcome in age- and sex-defined subgroups of patients with advanced Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. 2003; 14:282–290.
- Dinand V, Dawar R, Arya LS, et al. Hodgkin's lymphoma in Indian children: prevalence and significance of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Eur J Cancer*. 2006. [Epub ahead of print].
- Harris NL. Hodgkin's disease: classification and differential diagnosis. *Mod Pathol*. 1999;12:159–175.
- Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457–481.
- Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observations of each patient, II: analysis and examples. *Br J Cancer*. 1977;35: 1–39.
- De Matteo E, Vijnovich A, Chabay P, et al. Comparison of Epstein Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127: 1325–1329.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, Censo 2000. Available at: <http://www.ibge.gov.br/>. Accessed on January 2007.
- Araujo I, Bittencourt A, Barbosa H, et al. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. *Virchows Arch*. 2006;449: 315–319.
- de Oliveira DE, Bacchi M, Abreu E, et al. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection. *Am J Clin Pathol*. 2002;118: 25–30.
- Vasallo J, Paes R, Soares F, et al. Histological classification of 1.025 cases of Hodgkin's lymphoma from the State of Sao Paulo, Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2005;123:134–136.
- Loureiro MM, Morais JC, Milito CB, et al. Expression of Epstein-Barr virus in patients with Hodgkin's disease: report of 64 cases from Rio de Janeiro, Brazil. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40:37–40.
- Armstrong AA, Alexander FE, Cartwright R, et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia*. 1998;12:1272–1276.
- Preciado MV, De Matteo E, Diez B, et al. Presence of Epstein-Barr virus and strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin's disease. *Blood*. 1995;86:3922–3929.
- Vasallo J, Metzke K, Traina F, et al. Expression of Epstein Barr virus in Hodgkin's lymphoma in Brazilian adult patients. *Haematologica*. 2001;86:1227–1228.
- Chabay PA, De Matteo EN, Aversa L, et al. Assessment of Epstein-Barr virus association with pediatric non-Hodgkin lymphoma in

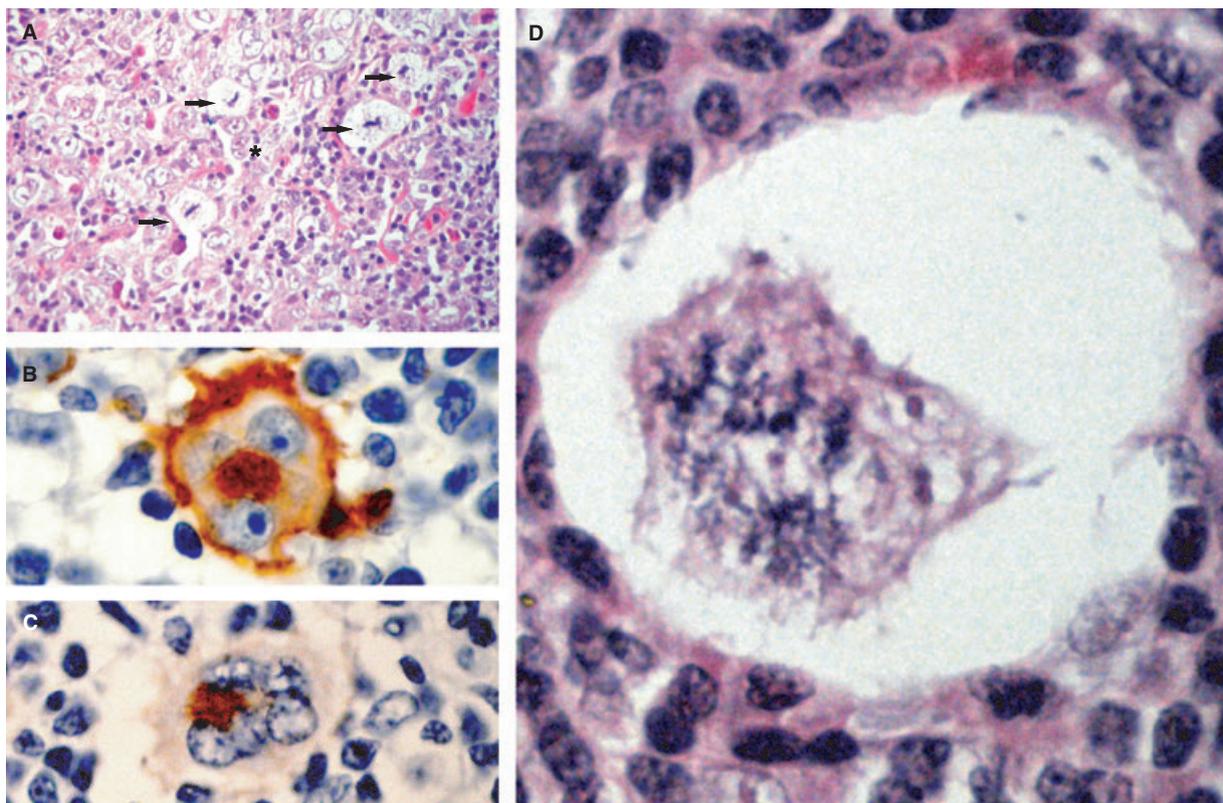
- immunocompetent and in immunocompromised patients in Argentina. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126:331–335.
34. Klumb CE, Hassan R, De Oliveira DE, et al. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer.* 2004;108:66–70.
  35. Chabay P, Burna V, Moar A, et al. Prevalencia de la infeccion por el virus de Epstein Barr en pacientes pediatricos. *Rev Hosp Ninos B Aires.* 1999;41:88–91.
  36. Figueira-Silva Cecilia M, Pereira Fausto EL. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004;37:409–412.
  37. Poppema S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2005;1:231–238.
  38. Engel M, Essop M, Close P, et al. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. *J Clin Pathol.* 2000;53:182–186.
  39. Re D, Zander T, Diehl V, et al. Genetic instability in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2002;13(suppl 1):19–22.
  40. Sanchez-Aguilera A, Montalban C, de la Cueva P, et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006;108:662–668.

## CLINICAL PICTURE

**Syncytial neoplastic cells in paediatric Hodgkin lymphoma**

A 14-yr-old female was admitted with a 3-month history of fever and cervical nodules. Histopathological analysis of a lymph node biopsy indicated Hodgkin lymphoma. Presence of high number of Reed-Sternberg (RS) and Hodgkin cells (156 in 10 high power field – hpf), 51 mitoses/10 hpf and syncytial cells; (see Fig. 1A, arrows indicating mitotic tumour cells and asterisk showing a typical RS cell; HE 400x) required differential diagnosis with anaplastic lymphoma. Immunohistochemical detection of CD30 and CD15 expression in neoplastic cells (Fig. 1B and C; 1000x), as well as negative CD3, CD20 and ALK expression preferentially indicated Hodgkin lymphoma, of nodular sclerosis (grade II) subtype. The patient, treated with the ABVD protocol achieved a sustained, complete clinical response. Epstein–Barr virus was not detected in tumour cells either by *in situ* hybridisation with fluores-

cein-conjugated probes against EBER RNAs (EBER-ISH) or by immunohistochemistry for LMP1. p53 immunodetection showed protein accumulation in more than 75% of neoplastic cells although with p21 (*cip-1/waf-1*) expression above 50%, indicating functional p53. Fig. 1D shows a syncytial neoplastic cell (1000x), with at least seven mitotic plates including one disrupted mitosis and six with aligned chromosomes, as well as three interphase nuclei with prominent nucleoli. Unlike most malignant tumours, classical HL is not characterized by a high number of Hodgkin- and RS-cells; these accounting for only 2–10% of the tumour mass. RS cells are multinucleated while Hodgkin cells are often near-triploid. Abnormal proliferation of H/RS cells, resulting from mitotic arrest followed by defective cytokinesis and/or DNA endoreduplications, accounts for multinucleation and polyploidy. Uncoupling



**Figure 1** (A) arrows indicating mitotic tumour cells and asterisk showing a typical Reed-Sternberg cell, HE 400x. (B) Detection of CD30 in neoplastic cells, 1000x. (C) Neoplastic cell positive to CD15, 1000x. (D) Syncytial neoplastic cell, with at least seven mitotic plates including one disrupted mitosis and six with aligned chromosomes, as well as three interphase nuclei with prominent nucleoli, HE 1000x.

events affecting mitosis/cell-death checkpoints might be involved originating this tumour phenotype.

**Mário Henrique M. Barros, Ilana Zalcborg, Rocio Hassan**

Bone Marrow Transplantation Centre (CEMO) Instituto Nacional de Câncer (INCA). Praça Cruz Vermelha 23, 6º Andar, 20230-130, Rio de Janeiro, Brazil

**Correspondence** Mário Henrique M. Barros, Bone Marrow Transplantation Centre (CEMO) Instituto Nacional de Câncer (INCA). Praça Cruz Vermelha 23, 6º Andar, 20230-130, Rio de Janeiro, Brazil. Tel: +55 21 25066506; Fax: +55 21 25066217; e-mail: biomol@inca.gov.br

## Number of involved anatomic areas as a risk predictor in pediatric Hodgkin's lymphoma: a retrospective study

Adriana Morais,<sup>1</sup> Mário Henrique M. Barros,<sup>2</sup> Rocio Hassan,<sup>3</sup>  
Vera L. L. Morais,<sup>1</sup> Maria Tereza C. Muniz<sup>4</sup>

### Abstract

**Objective:** To determine if the number of involved anatomic areas can modify the standard risk groups in pediatric Hodgkin's lymphoma, identifying children who would benefit from a reduction in treatment intensity.

**Methods:** Retrospective study evaluating age, sex, histology, Ann-Arbor stage, presence of B symptoms, number of involved anatomic areas, risk grouping (favorable vs. unfavorable), and laboratory exams. All patients received doxorubicin-containing chemotherapy. Patients in complete remission for 5 years or longer were evaluated as for late effects.

**Results:** Sixty-nine patients (2-18 years) were included, 68% belonged to the unfavorable risk group. Overall survival and event-free survival were 94 and 87%, respectively. Late effects were screened in 46 cases. Advanced stage and  $\geq$  four involved anatomic areas had negative impact on event-free survival, while only the number of involved anatomic areas retained statistical significance when using Cox analysis (hazard ratio = 6.4, 95%CI = 1.08-38.33;  $p = 0.04$ ). Risk groups were adjusted by number of involved anatomic areas ( $< \text{four}/\geq \text{four}$  involved anatomic areas), with a significant reallocation of patients ( $p = 0.008$ ). Of the 30 patients with late effects, 21 were in the original unfavorable risk group and 14 (66.6%) could have been reallocated to the favorable risk group based on the number of involved anatomic areas.

**Conclusion:** If re-stratification had been applied, a considerable number of children would have received less intensive treatment and, consequently, could have had lower chances of late effects. A prospective study could define if adjustment of risk group by number of involved anatomic areas would have any impact on survival rates.

*J Pediatr (Rio J). 2009;85(3):236-242: Hodgkin's lymphoma, childhood, risk groups, involved anatomic areas, late effects.*

### Introduction

Hodgkin's lymphoma (HL) is a disease typically affecting children and young adults, with more than 80% of patients being cured.<sup>1</sup> The other side of this high cure rate is that a fraction of patients will receive excessive antineoplastic radiochemotherapy resulting in the well-recognized late effects of HL treatment.<sup>2-6</sup> Current clinical and radiological characteristics used for risk stratification in most treatment

centers lead to mistaken stratification in almost one third of patients.<sup>7</sup> Prognostic factors in HL are, mostly, crude direct measures of tumor burden and activity (stage, number of involved lymph nodes, bulky disease, B symptoms) or indirect surrogate measures of tumor burden and activity based on laboratory parameters (hemoglobin, s-albumin levels).<sup>8,9</sup> Clinical characteristics at presentation,<sup>10,11</sup> as

1. MD. Oncohematology Pediatric Center, Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Recife, PE, Brazil.
2. MD. Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
3. PhD. CEMO, INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
4. Oncohematology Pediatric Center, HUOC, Recife, PE, Brazil. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brazil.

Financial support: Swissbridge Foundation (Switzerland) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

No conflicts of interest declared concerning the publication of this article.

**Suggested citation:** Morais A, Barros MH, Hassan R, Morais VL, Muniz MT. Number of involved anatomic areas as a risk predictor in pediatric Hodgkin's lymphoma: a retrospective study. *J Pediatr (Rio J)*. 2009;85(3):236-242.

Manuscript received Dec 29 2008, accepted for publication Mar 04 2009.

doi:10.2223/JPED.1891

well as protein immunoexpression<sup>10,12-14</sup> and Epstein-Barr virus (EBV) association,<sup>15-17</sup> have also been identified as prognostic factors in several studies.

However, when sufficiently intensive treatment for advanced stages is employed, adverse prognostic factors tend to disappear.<sup>9</sup> Thus, the identification of clinical and biological factors that allow discrimination of patients who may undergo a reduction in treatment intensity is a current goal to reduce late effects in HL.

The objective of this single-center study was to identify pretreatment characteristics that could be useful for adjustment of risk stratification in children with HL.

## **Materials and methods**

### **Patients**

Sixty-nine patients up to 18 years old diagnosed with HL in the Pediatric Oncology Center (Centro de Oncohematologia Pediátrica, CEONHPE) of Oswaldo Cruz University Hospital, Recife, state of Pernambuco, Brazil, between March 1980 and January 2006 were included in this study. Inclusion was based on the availability of formalin-fixed paraffin-embedded HL tissue and complete clinical data for retrospective analysis. This study was approved by the Institutional Ethics Board.

### **Histopathology**

HL diagnosis was reviewed according to the morphological criteria of the World Health Organization classification<sup>18</sup> and confirmed by immunohistochemical staining, using CD30 (clone Ki-1, dilution, 1:40), CD15 (clone C3D-1, 1:50) and CD20 (clone L-26, 1:1000, Dako, Glostrup, Denmark).

### **Staging and laboratory evaluation**

All patients were assessed before starting therapy by means of clinical history, complete physical examination, blood counts and biochemical profile, chest x-ray films, computed tomography of chest and abdomen and unilateral bone marrow biopsy. Staging followed the Ann-Arbor classification system.<sup>19</sup> B symptoms were characterized by fever  $\geq 38$  °C for at least 3 consecutive days, night sweats and loss of weight. Disease risk was classified as favorable (I, IIA, IIIA) or unfavorable (IIB, IIIB, IV). Anemia was defined as hemoglobin  $< 13$  g/dL ( $< 11.5$  g/dL for female patients in reproductive age). Lactate dehydrogenase (LDH) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were considered high when higher than 500 IU/L and 40 mm/h, respectively.

### **Treatment**

All patients received doxorubicin-containing chemotherapy. Alternating Adriamycin<sup>TM</sup>, bleomycin, vinblastine and dacarbazine/vincristine, procarbazine, prednisone and Adriamycin<sup>TM</sup> (ABVD/OPPA) were

administered to 33 children (47.8%) until 1996 and ABVD alone, to 36 children (52.2%) after 1996, respectively.<sup>20,21</sup> Children in the favorable risk group were treated with three cycles of chemotherapy, while those in the unfavorable risk group received six cycles. Low-dose involved-field radiotherapy was administered to all patients, except for one patient with stage IA, at the end of chemotherapy protocol (15 Gy for patients that achieved complete response and 25 Gy for those with bulky disease at presentation or local residual disease at the end of chemotherapy).

### **Variables analyzed as potential prognostic factors**

Pretreatment variables were: age, sex, histology, Ann-Arbor stage, presence of B symptoms, number of involved anatomic areas (IAA), risk grouping (favorable vs. unfavorable), LDH level, ESR and anemia. Albumin level, white blood cell counts and biochemical profile were unavailable for more than 10% of the patients; therefore, these data were not analyzed as prognostic factors.

The following sites were taken into account for the calculation of the number of IAA: Waldeyer's ring, cervical and/or supraclavicular lymph nodes (right or left, separately), axillary and/or infraclavicular lymph nodes (right or left separately), epitrochlear nodes (right or left, separately), mediastinal plus hilar lymph nodes (one site), para-aortic and/or retrocrural lymph nodes (one site), porta hepatis lymph nodes (one site), mesenteric (one site), iliac and/or inguinal/femoral lymph nodes (right or left, separately), spleen and splenic hilar lymph nodes (one site). Each extranodal site was considered separately. Each lung was also considered as a separate site. In the case of multiple bone lesions, bone was considered as one involved site.

### **Late effect evaluation**

Patients in complete remission for 5 years or more were recalled by the Cured Evaluation Program at the CEONHPE. Late effect screening consisted of hematological and hormone analyses, fertility tests, cardiac evaluation by annual electrocardiogram and echocardiogram until the end of growth, pulmonary function tests, audiometry, renal function tests and psychological evaluation, as described.<sup>3</sup>

### **Statistical analysis**

Associations between categorical variables were tested using two-tailed Pearson's chi-square and Fisher's exact tests. Significance was set at  $p < 0.05$ . Event-free survival (EFS) was estimated as the interval (in months) from diagnosis to relapse or death by any cause or, alternatively, to the last follow-up. Overall survival (OS) refers to the lapse (in months) from diagnosis to death or last follow-up. Survival distributions were estimated according to the Kaplan-Meier method,<sup>22</sup> and differences were assessed by the log-rank test. Multivariate analysis

using Cox proportional hazard regression<sup>23</sup> was performed to determine the independent prognostic factors influencing EFS. Data were analyzed with SPSS v.13.0.

## Results

### ***Clinical and demographic characteristics at presentation***

Of the 69 patients included in this study, 49 (71%) were male (M:F 2.45:1). Ages ranged from 2 to 18 years (median 11 years), with 56.5% (39/69) of patients in the >10 years group. Most of the patients had disease stage I or II (36/69, 52.1%). B symptoms were observed in 47/69 (68.1%) cases. The analysis by risk group showed that 22/69 patients were (31.9%) in the favorable and 47/69 (68.1%) in the unfavorable risk group. Nodular sclerosis was the most common histological subtype (51/69 cases, 74%), followed by mixed cellularity (17/69, 24.6%). Hemoglobin levels were evaluated in 59 children, varying from 7.4 to 16 g/dL (median 11.3). Anemia was observed in 23 patients (33.3%) (Table 1).

The number of IAA varied from one to eight (median two). When the group was classified according to the number of IAA (< four or ≥ four IAA), 17 children (24.6%) showed ≥ four IAA, while 52 (75.4%) showed < four IAA. A number of ≥ four IAA showed association with stages III/IV (16/17, 94%,  $p = 0.0001$ ), B symptoms (16/17, 94%,  $p = 0.008$ ), unfavorable risk group (16/17, 94%,  $p = 0.0001$ ), and anemia (10/15, 66.6%,  $p = 0.01$ ). In multivariate analysis, the number of IAA was associated only with stage (95%CI -0.5 to -0.1,  $p = 0.0005$ ).

### ***Treatment response and survival analysis***

Sixty patients (87%) finished the treatment and did not relapse, while six patients (8.7%) relapsed after the end of treatment and three (4.3%) during the first-line treatment. Sixty-five patients are alive and in complete response (94.2%), three (4.3%) died because of HL progression and one died of a chondrosarcoma secondary to HL treatment. The median length of follow-up was 82 months (12-332 months); the shortest follow-up (12 m) involved a patient who died of disease progression. The OS and EFS rates for the whole group were 94.2 and 87%, respectively (Figure 1).

Since both protocols used in the treatment of the patients (ABVD/OPPA and ABVD) are considered equivalent in their ability to induce complete response<sup>20,21</sup> and no differences either in survival ( $p = 0.6$ ) or in demographic and clinical characteristics (data not shown) were observed between the two groups, all patients were included in the survival analyses. Children with stage IV showed the worst EFS when compared to children with other stages (40 vs. 100, 89.7 and 89.3% for stages I, II and III, respectively;

$p = 0.002$ ). The number of IAA showed a strong effect on EFS; 64.7% in children with ≥ four IAA compared with 94.2% in patients with < four IAA ( $p = 0.0001$ ); while anemia showed a borderline effect (78.3 vs. 94.4% in children without anemia;  $p = 0.06$ ). Sex, age group, risk group, B symptoms, LDH levels, ESR and histological subtypes had no significant effects on EFS (Table 1). Stage IV (60%,  $p = 0.001$ ), anemia (87 vs. 100% in nonanemic patients;  $p = 0.03$ ) and ≥ four IAA (82.4 vs. 98.1% in < four IAA;  $p = 0.001$ ) significantly impacted on OS.

A Cox analysis was performed including the significant EFS variables in univariate analyses. The number of IAA was an independent prognostic factor (hazard ratio [HR] 6.4, 95%CI 1.08-38.33;  $p = 0.04$ ), while stage lost significance.

The former results suggested that the number of IAA could be used to improve the risk stratification system. Thus, the original risk groups were adjusted by the number of IAA: cases with unfavorable disease and < four IAA were reclassified as "favorable disease" (except for extranodal disease that was maintained as unfavorable), and children with favorable disease and ≥ four IAA were reclassified to the unfavorable disease group. With this reallocation, only one of the 22 patients initially in the favorable risk group was reallocated to the adjusted unfavorable risk group; however, of the 47 patients originally in the unfavorable risk group, 31 (66%) were reallocated to the favorable risk group, while 16 (34%) remained in the unfavorable risk group ( $p = 0.008$ ) (Figure 2). The adjusted risk groups were better predictors of EFS than the original ones: 94.2 vs. 64.7% of EFS for the adjusted favorable and unfavorable risk groups, respectively ( $p = 0.0005$ ), compared with 95.5 vs. 83% of EFS ( $p = 0.1$ ) for the original risk groups.

To avoid statistical bias due to the inclusion of patients submitted to different intensity treatments, EFS was analyzed separately for each risk group. No differences were observed among the patients who received low-intensity treatment: the only relapsed patient had < four IAA and was originally in the favorable risk group ( $p = 0.4$ ). Conversely, in the group of intensively treated patients, results were comparable to those observed in the whole group (93.5 vs. 62.5% of EFS, adjusted favorable and unfavorable risk groups, respectively;  $p = 0.003$ ). A Cox regression was performed in the intensive treatment group, reinforcing the independent prognostic impact of the adjusted risk group for unfavorable disease (HR 6.7, 95%CI 1.07-42.1;  $p = 0.04$ ).

Forty-six patients responded to recall for late effect screening. Thirty patients (65%) exhibited some kind of late effects, cardiotoxicity and endocrine dysfunction being the most frequent. Four children developed a second neoplasm (chondrosarcoma, thyroid carcinoma, rhabdomyosarcoma and myelodysplastic syndrome, respectively) (Table 2). Most patients with late effects were in the original unfavorable risk group (21/30, 70%). Fourteen of the 31 children (45%)

**Table 1** - Clinical and histological characteristics of Hodgkin's lymphoma patients

Variable	Cases analyzed n (%)	EFS % (no. events/total)	Univariate analysis
Age (years)			
Median (range)	11 (2-18)		p = 0.2
≤ 10	30/69 (43.5)	80 (6/30)	
> 10	39/69 (56.5)	92.3 (3/39)	
Sex			p = 0.1
Male	49/69 (71)	89.8 (5/49)	
Female	20/69 (29)	80 (4/20)	
Anemia			p = 0.06
Yes	23/59 (39)	78.3 (5/23)	
No	36/59 (61)	94.4 (2/36)	
LDH			p = 0.2
Median			
Normal	30/59 (50.8)	93.3 (2/30)	
High	29/50 (49.2)	86.2 (4/29)	
ESR			p = 0.2
Median (range)	59.5 (2-140)		
Normal	18/59 (30.5)	100 (0)	
High	41/59 (69.5)	87.8 (5/41)	
Number of anatomic areas			p = 0.0005
Median (range)	2 (1-8)		
< 4	52/69 (75.4)	94.2 (3/52)	
≥ 4	17/69 (24.6)	64.7 (6/17)	
Stage			p = 0.002
I	7/69 (10.1)	100 (0)	
II	29/69 (42)	89.7 (3/29)	
III	28/69 (40.6)	89.3 (3/28)	
IV	5/69 (7.2)	40 (2/5)	
B symptoms			p = 0.1
Yes	22/69 (31.9)	83 (8/47)	
No	47/69 (68.1)	95.5 (1/22)	
Risk group			p = 0.1
Favorable	22/69 (31.9)	95.5 (1/22)	
Unfavorable	47/69 (68.1)	83 (8/47)	
Histopathological diagnosis			p = 0.8
Nodular sclerosis	51/69 (73.9)	88.2 (6/51)	
Mixed cellularity	17/69 (24.6)	82.4 (3/17)	
Lymphocyte-depleted	1/69 (1.4)	100 (0)	

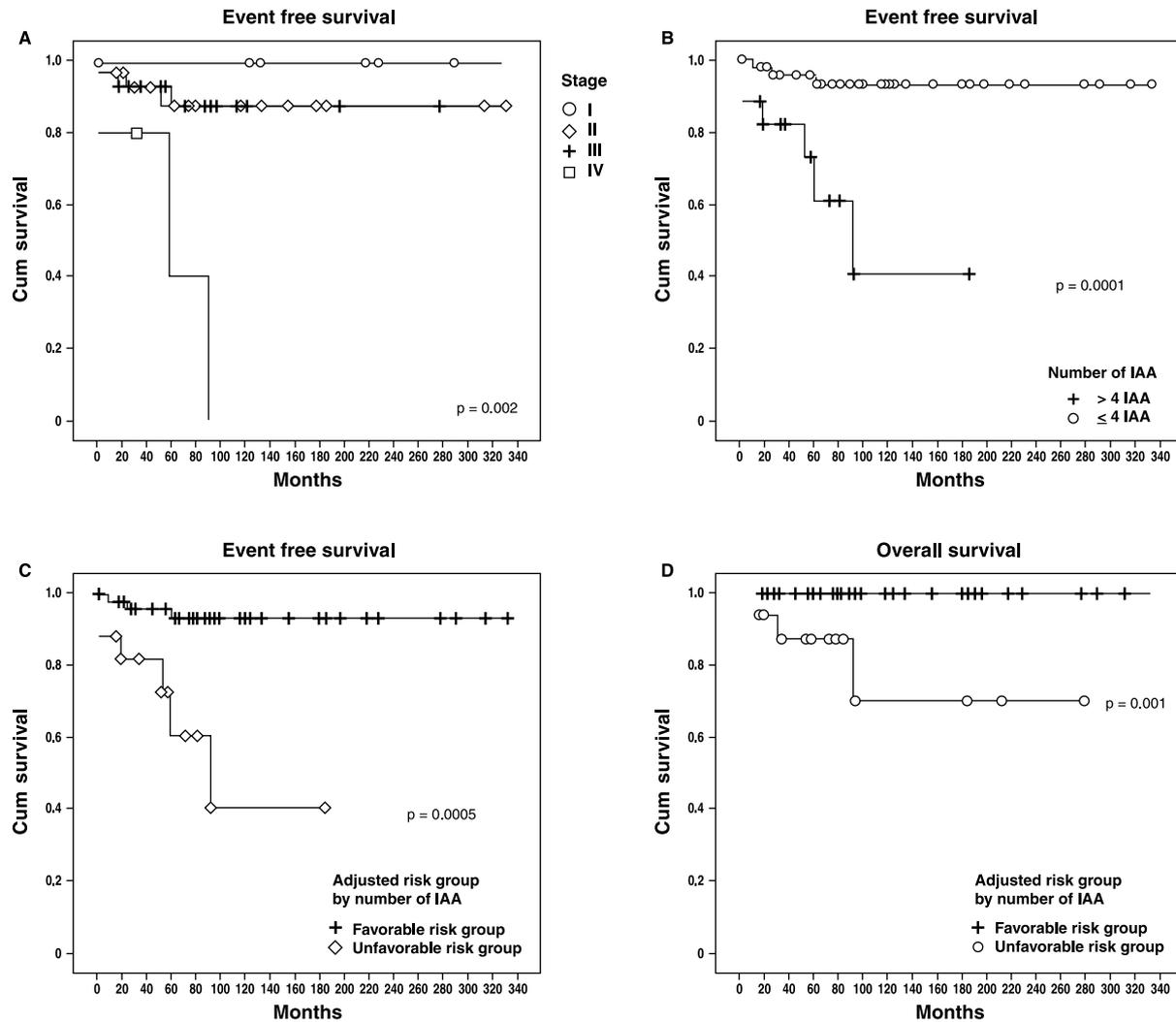
EFS = event-free survival; ESR = erythrocyte sedimentation rate; LDH = lactate dehydrogenase.  
B symptoms = fever ≥ 38 °C for at least 3 consecutive days, night sweats and loss of weight.

reallocated from the original unfavorable risk group to the favorable risk group based on the number of IAA exhibited late effects (p = 0.005)

## Discussion

In respect to clinical outcome, our results with a risk-adapted, homogeneously treated group of patients achieved survival rates comparable to those obtained in developed countries<sup>2,5,24,25</sup> and in the most developed region of Brazil.<sup>21</sup> The late effects were also similar to those described in other studies that treated children with the same protocols.<sup>1-6</sup> With the current risk-stratified treatment for HL, long-term disease-free survivals (DFS)

were 85 to 100% in patients with early-stage disease, and more than 60% in those with advanced disease.<sup>26</sup> The German Hodgkin Study Group showed an improvement of survival for patients with advanced stages when more intensive treatments were applied.<sup>4</sup> However, it is well known that higher survival rates are accompanied by late effects of treatment, mostly in patients treated during childhood.<sup>5</sup> For example, the excellent results reached in high stages by the German Hodgkin Study Group were associated with a higher frequency of secondary acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome.<sup>4</sup> Thus, it is accepted that the challenge today in HL treatment is to minimize late toxicity without compromising the excellent survival rates.



Cum = cumulative; IAA = involved anatomic areas.

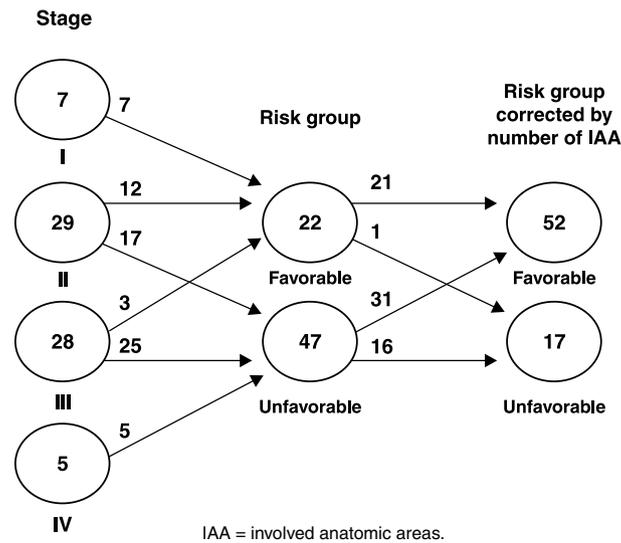
Figure 1 - Survival analysis

Table 2 - Distribution of patients with late effects by risk group

Late effects	Affected/evaluated patients (%)	Risk group*	
		Favorable (%)	Unfavorable (%)
Cardiotoxicity	18/37 (48.6)	4/18 (22.2)	14/18 (77.8)
Endocrine alterations	9/40 (22.5)	3/9 (33.4)	6/9 (66.6)
Bone alterations	1/40 (2.5)	1/1 (100)	0
Pulmonary toxicity	2/40 (5)	1/2 (50)	1/2 (50)
Renal toxicity	2/40 (5)	1/2 (50)	1/2 (50)
Audiologic alterations	2/40 (5)	0	2/2 (100)
Cosmetic alterations†	6/44 (13.6)	2/6 (33.3)	4/6 (66.7)
Second neoplasm	4/44 (9.1)	2/2 (50)	2/2 (50)
Total	30/46 (65.2)	9/30 (30)	21/30 (70)

\* Original risk group (without number of involved anatomic sites reallocation).

† Atrophy of skin secondary to radiotherapy.



**Figure 2** - Adjusted risk groups by number of IAA

It was showed that children with more than four IAA had a 6.4-fold increased risk of unfavorable outcome. The results agree with those of Vassilakopoulos et al., who showed a significant influence of this variable in DFS prediction in adolescents and adults with advanced-stage disease.<sup>10</sup> Conversely, a previous study on childhood HL did not show a significant effect of IAA on DFS.<sup>27</sup> The discordance between the results of this current study and those reported by Oguz et al.<sup>27</sup> might be due to the fact that the latter study only considered the number of involved nodal sites, suggesting that the number of total involved sites (nodal and extranodal) may be a better predictor of prognosis in pediatric HL.

The number of IAA may be a surrogate indicator of tumor burden, a strong adverse prognostic factor for HL albeit a difficult variable to quantify or even estimate.<sup>27-31</sup> Staging is unable to predict tumor burden with more accuracy because it does not consider the number of affected anatomic sites. For example, a stage IIA patient with cervical and axillary nodes, both on the same body side, would have a lower tumor burden than another patient with no symptoms and cervical and axillary bilateral involvement, who would also be staged as IIA. Therefore, it is possible that some children with advanced-stage disease are overtreated.<sup>9</sup> The results of this study indicate that a subgroup of patients with better prognosis can be identified among the unfavorable-risk patients, based on tumor burden as defined by number of IAA, and suggest that the main negative consequence of tailoring chemotherapy based only on the stage and/or

risk group (stage combined with presence of B symptoms) is the overtreatment of a group of patients stratified as advanced-disease, without having a high tumor burden.

The limitation of this retrospective study is the absence of early response evaluation by positron emission tomography, a current conduct of the modern HL therapy, but not feasible to all oncology centers from developing countries. Because of this, studies that try to obtain the best methodology to estimate the tumor burden and define therapeutic conducts are still important.

The present study aimed, through a balance of risk between treatment response and late effects in a carefully followed cohort, to identify pretreatment factors for risk adjustment in unfavorable disease. The number of IAA is an easily obtainable clinical parameter that could be potentially incorporated to stratify patients with the aim of reducing late toxicity in pediatric HL. If re-stratification had been applied in this study group, a considerable number of children would have received less intensive treatment and, consequently, could have had lower chances of late effects. Undoubtedly, a prospective study is mandatory to confirm if the proposed reallocation will modify the survival rates.

#### Acknowledgements

This study was partially supported by the Swissbridge Foundation, Switzerland, and by *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, Brazil.

## References

1. Hodgson DC. *Hodgkin Lymphoma: the follow-up of long-term survivors*. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008;22:233-44.
2. Thomson AB, Wallace WH. *Treatment of paediatric Hodgkin's disease. A balance of risks*. *Eur J Cancer*. 2002;38:468-77.
3. Barros MH, Morais VL, Soares SM, Leite EP, Ramos SV. *Late effects in Brazil: experience of the Cured Evaluation Program*. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41:361 (Abstract).
4. Diehl V, Klimm B, Re D. *Hodgkin lymphoma: a curable disease: what comes next?* *Eur J Haematol Suppl*. 2005;(66):6-13.
5. Schwartz CL. *Special issues in pediatric Hodgkin's disease*. *Eur J Haematol Suppl*. 2005;(66):55-62.
6. Hodgson DC, Hudson MM, Constine LS. *Pediatric Hodgkin lymphoma: maximizing efficacy and minimizing toxicity*. *Semin Radiat Oncol*. 2007;17:230-42.
7. Montalbán C, García JF, Abaira V, González-Camacho L, Morente MM, Bello JL, et al. *Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group*. *J Clin Oncol*. 2004;22:1664-73.
8. Specht L, Nordentoft AM, Cold S, Clausen NT, Nissen NI. *Tumor burden as the most important prognostic factor in early stage Hodgkin's disease. Relations to other prognostic factors and implications for choice of treatment*. *Cancer*. 1988;61:1719-27.
9. Hasenclever, D. *The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease*. *Ann Oncol*. 2002;13 Suppl 1:75-8.
10. Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Kontopidou FN, Dimopoulou MN, Barbounis A, et al. *Prognostic factors in advanced stage Hodgkin's lymphoma: the significance of the number of involved anatomic sites*. *Eur J Haematol*. 2001;67:279-88.
11. Zander T, Wiedenmann S, Wolf J. *Prognostic factors in Hodgkin's lymphoma*. *Ann Oncol*. 2002;13 Suppl 1:67-74.
12. Morente MM, Piris MA, Abaira V, Acevedo A, Aguilera B, Bellas C, et al. *Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression*. *Blood*. 1997;90:2429-36.
13. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Viviani S, Bonfante V, Nadali GP, Vassilakopoulos TP, et al. *CD20 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease: associations with presenting features and clinical outcome*. *J Clin Oncol*. 2002;20:1278-87.
14. Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, de la Cueva P, Sánchez-Verde L, Morente MM, García-Cosío M, et al. *Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma*. *Blood*. 2006;108:662-8.
15. Engel M, Essop MF, Close P, Hartley P, Pallesen G, Sinclair-Smith C. *Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases*. *J Clin Pathol*. 2000;53:182-6.
16. Claviez A, Tiemann M, Lüders H, Krams M, Parwaresch R, Schellong G, et al. *Impact of latent Epstein-Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin's lymphoma*. *J Clin Oncol*. 2005;23:4048-56.
17. Jarrett RF, Stark GL, White J, Angus B, Alexander FE, Krajewski AS, et al. *Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study*. *Blood*. 2005;106:2444-51.
18. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et Vardiman JW, eds. *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2001.
19. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. *Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification*. *Cancer Res*. 1971;31:1860-1.
20. Hudson M, Onciu M, Donaldson S. *Hodgkin lymphoma*. In: Pizzo P, Poplack D, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p.: 695-721.
21. Viani GA, Castilho MS, Novaes PE, Antonelli CG, Ferrigno R, Pellizzon CA, et al. *Chemotherapy followed by low dose radiotherapy in childhood Hodgkin's disease: retrospective analysis of results and prognostic factors*. *Radiat Oncol*. 2006;1:38.
22. Cox, DR. *Regression Models and life tables (with discussion)*. *J R Stat Soc B*. 1972;34:187-220.
23. Kaplan E, Meier P. *Non Parametric estimation from incomplete observations*. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457-81.
24. Oberlin O, Leverger G, Pacquement H, Raquin MA, Chompret A, Habrand JL, et al. *Low-dose radiation therapy and reduced chemotherapy in childhood Hodgkin's disease: the experience of the French Society of Pediatric Oncology*. *J Clin Oncol*. 1992;10:1602-8.
25. Schellong G, Pötter R, Brämswig J, Wagner W, Prott FJ, Dörffel W, et al. *High cure rates and reduced long-term toxicity in pediatric Hodgkin's disease: the German-Austrian multicenter trial DAL-HD-90. The German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Study Group*. *J Clin Oncol*. 1999;17:3736-44.
26. Smith RS, Chen Q, Hudson MM, Link MP, Kun L, Weinstein H, et al. *Prognostic factors for children with Hodgkin's disease treated with combined-modality therapy*. *J Clin Oncol*. 2003;21:2026-33.
27. Oguz A, Karadeniz C, Okur FV, Citak EC, Pinarli FG, Bora H, et al. *Prognostic factors and treatment outcome in childhood Hodgkin disease*. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;45:670-5.
28. Gobbi PG, Ghirardelli ML, Solcia M, Di Giulio G, Merli F, Tavecchia L, et al. *Image-aided estimate of tumour burden in Hodgkin's disease: evidence of its primary prognostic importance*. *J Clin Oncol*. 2001;19:1388-94.
29. Specht L, Nissen NI. *Prognostic factors in Hodgkin's disease stage IV*. *Eur J Haematol*. 1988;41:359-67.
30. Specht L, Nissen NI. *Prognostic factors in Hodgkin's disease stage III with special reference to tumour burden*. *Eur J Haematol*. 1988;41:80-7.
31. Specht L, Nissen NI. *Hodgkin's disease and age*. *Eur J Haematol*. 1989;43:127-35.

### Correspondence:

Maria Tereza Cartaxo Muniz  
 Laboratório de Biologia Molecular  
 Centro de Oncohematologia Pediátrica  
 Hospital Universitário Oswaldo Cruz  
 Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro  
 CEP 50100-130 - Recife, PE - Brazil  
 E-mail: tcartaxo.upe@hotmail.com

## ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

**Cell cycle characteristics and Epstein–Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients**MÁRIO HENRIQUE M. BARROS<sup>1</sup>, ADRIANA SCHELIGA<sup>2</sup>, ELENA DE MATTEO<sup>3</sup>, CAROLINA MINNICELLI<sup>1</sup>, FERNANDO A. SOARES<sup>4</sup>, ILANA R. ZALCBERG<sup>1</sup>, & ROCIO HASSAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup>Clinical Oncology Department, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup>Pathology Department, Ricardo Gutiérrez Children's Hospital, Buenos Aires, Argentina, and <sup>4</sup>Pathology Department, A. C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil

(Received 4 November 2009; revised 15 March 2010; accepted 24 April 2010)

**Abstract**

We investigated the correlation of tumor characteristics with clinico-biological markers of aggressive disease, evaluated by Ann Arbor stage, risk group, B-symptoms, number of involved anatomic areas, mediastinal mass, nodular sclerosis (NS) grade, and risk, in pediatric Hodgkin lymphoma (HL). Leukopenia and extranodal disease influenced event-free survival ( $p = 0.032$  and  $p = 0.042$ ). In multivariate analysis, extranodal disease was associated with high number of tumor-infiltrating eosinophils ( $p = 0.035$ ) and Ki67  $< 50\%$  ( $p = 0.024$ ); B-symptoms with Ki67  $\geq 75\%$  ( $p = 0.027$ ) and high LDH levels ( $p = 0.001$ ); and mediastinal mass with leukopenia ( $p = 0.048$ ), NS grade II ( $p = 0.025$ ), and high-risk ( $p = 0.046$ ). Furthermore, low stages correlated with Ki67  $\geq 50\%$  ( $p = 0.005$ ) and Epstein–Barr virus (EBV) ( $p = 0.065$ ). Low-risk NS was associated with EBV ( $p = 0.014$ ). Hierarchical cluster analysis identified two clusters, one composed of high-risk patients and cell cycle and apoptosis features, and the other including low-risk patients, EBV, and low-risk NS. Our results show the association of biological markers with disease aggressiveness in pediatric HL.

**Keywords:** Hodgkin lymphoma, childhood, nodular sclerosis, p53, proliferative index, EBV

**Introduction**

The present risk-adapted therapy for pediatric Hodgkin lymphoma (HL) allows excellent survival rates, although with increasing late effects [1], i.e. cardiotoxicity and secondary leukemia or myelodysplastic syndrome [2,3]. Thus, the development of strategies to reduce treatment related morbidity without reducing the cure rate is a current goal in the treatment of pediatric HL [4]. Clinical and biological factors that allow identification of patients who may accept a reduction of treatment intensity could be used to guide such therapeutic strategies. However, the current treatment efficiency has

contributed to the disappearance of prognostic factors [5], the histological grading of nodular sclerosis (NS) being a classic example [6].

Disease aggressiveness can be defined on histological and clinical bases and is influenced by defects in cell cycle and apoptosis pathways [7,8], although few of these characteristics are, in the current state of HL treatment, of prognostic value [8]. Epstein–Barr virus (EBV) is pathogenically related to a fraction of HL cases [9], but its influence on tumor characteristics is only recently starting to emerge [10,11]. It is likely that with a reduction of treatment intensity, factors at present not associated with differences in survival could negatively influence

treatment response. On the other hand, identification of factors associated with low aggressiveness, for instance associated with the tumor microenvironment, could help in the design of future therapies [12]. With this in mind, we sought to identify patterns of histological, immunophenotypic, and cell cycle factors as well as EBV status that can be related with clinical and biological variables classically associated with aggressive disease in pediatric HL at diagnosis.

## Materials and methods

### Patients and treatments

One hundred and four children and adolescents (up to 18 years old) diagnosed with classical HL at the Instituto Nacional do Câncer (INCA) between 1999 and 2006 were included in this study, based on the availability of formalin-fixed paraffin-embedded tissue and complete clinical data for retrospective analysis. Pre-treatment factors evaluated for disease aggressiveness were age-group ( $\leq 10$  years vs.  $> 10$  years), Ann Arbor stage, presence of B-symptoms and mediastinal mass, number of involved anatomic areas (IAAs) (nodal and extranodal), presence of anemia (children  $< 12$  years: Hb  $< 12$  g/dL; male 12–18 years: Hb  $< 13.5$  g/dL; female 12–18 years:  $< 11.5$  g/dL), leukocyte count, leukopenia ( $< 4000$  leukocytes/ $\text{mm}^3$ ) and lymphopenia ( $< 800$  lymphocytes/ $\text{mm}^3$ ), high erythrocyte sedimentation rate (ESR) ( $> 13$  mm/h), lactate dehydrogenase (LDH) ( $> 480$  U/L), and  $\beta_2$ -microglobulin ( $> 1.73$  mg/dL). Evaluation of IAAs was performed as described [3]. Disease risk was classified as favorable (I, IIA, IIIA) or unfavorable (IIB, IIIB, IV). All patients received doxorubicin-containing chemotherapy. The ABVD protocol (adriamycin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine) was administered to 46 children (48.4%) and the German protocol HD90 to 49 children (51.6%). Low-dose involved-field radiotherapy was administered to all patients as proposed by the protocols. This study was approved by the INCA Ethics Committee.

### Histology

Diagnosis of classical HL was established by morphologic criteria according to the *World Health Organization classification of tumors* (WHO classification) [13]. All cases were independently reviewed by two pathologists (M.H.M.B. and E.D.M.); the discordant cases were analyzed in a double-head microscope until a diagnostic consensus was reached. The numbers of neoplastic cells, mitoses, and eosinophils were determined in 10 high-power fields (hpf). The NS subtype was graded according to

the British National Lymphoma Investigation (BNLI) as grade I (NS-GI) or II (NS-GII) [14]. Additionally, NS was classified as high- (NS-HR) or low-risk (NS-LR) based on eosinophil count, cell atypia, and lymphocyte depletion, as described by von Wasielewski *et al.* [15]. The interfollicular pattern was defined as the presence of frequent residual follicles or extensive follicular hyperplasia with interfollicular tumor infiltrate [16].

### Tissue microarray design

Paraffin blocks of 94/104 cases were suitable for tissue microarray (TMA) construction. A tissue arrayer device (Beecher Instruments, SilverSpring, MD, USA) was used to assemble the TMA block. In each case, two 1 mm diameter cores, selected from two different representative tumor areas, were included.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical (IHC) staining was performed on TMA sections using CD30 (clone Ki-1, dilution 1:40), CD15 (clone C3D-1, 1:50), CD20 (clone L-26, 1:1000), p53 (clone DO-7, 1:500), p21 (clone SX118, 1:50), Bcl2 (clone 124, 1:50), and Ki67 (clone MIB-1, 1:100) antibodies, all from Dako (Glostrup, Denmark). After incubation, immunodetection was performed with an LSAB (labeled streptavidin-biotin; Dako) visualization system or EnVision kit (Dako) (for CD30 and Bcl2 immunostaining).

A case was considered positive for CD30, CD15, or CD20 whenever any Hodgkin/Reed–Sternberg (H/RS) cell showed specific staining, according to the criteria of the WHO classification [13]. Positivity for p53 and p21 expression was defined when specific staining was detected in more than 50% of tumor cells, while Bcl2 cut-off was set at 10%, as described [8,17–19]. External and internal controls included in the TMA were taken into consideration to interpret stains. The combined expression of p53 and its downstream effector p21 was also used to classify cases according to p53 functionality [20,21], into the following categories: I, p53–/p21–; II, p53+/p21+; III, p53–/p21+; IV, p53+/p21–. Cases exhibiting patterns II and III were considered to bear a functional p53. Detection of Ki67 in more than 50% of H/RS cells defined a high proliferative index (PI), while expression  $\geq 75\%$  defined a very high PI.

### EBV detection

EBV association was determined by *in situ* hybridization (ISH) with fluorescein-conjugated probes to EBV-encoded RNAs (EBERs) (EBER-ISH) as

described [22], and immunodetection of the latent membrane protein 1 (LMP1) by IHC (clones CS1-4, 1:50; Dako). Positivity of lymphoma for EBV was defined when any H/RS cell showed nuclear EBER hybridization signals and/or membrane LMP1 immunostaining.

*Statistical analysis*

Pearson's  $\chi^2$ , Fisher's exact test, and logistic regression were used to test association between dichotomous variables, categorized according to the median values of quantitative traits and the above-described cut-offs for protein expression. Differences were considered significant at  $p < 0.05$  in two-tailed tests. Hierarchical cluster analysis using average linkage and binary simple matching measure allowed exploration of the structure of association among variables and markers of disease aggressiveness. Complete remission (CR) was defined as absence of disease after the end of therapy. Partial remission, lack of response, and progressive disease were considered as 'treatment failure.' Event-free survival (EFS) was the interval (in months) from diagnosis to relapse or death, or, alternatively, to the last follow-up. Overall survival (OS) refers to the lapse (in months) from diagnosis to death or last follow-up. Survival distributions were estimated by the Kaplan-Meier method [23], and differences were compared using the log-rank test [24]. Multivariate Cox proportional hazard regression analysis was used to determine the independent prognostic factors influencing EFS. Data were analyzed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software 13.0.

**Results**

*Clinical and histological characteristics*

Of the 104 patients, 68 (65.4%) were male and 36 (34.6%) female (M:F, 1.8:1). Ages ranged from 3 to 18 years (median 14 years), with 72.1% (75/104) in the > 10 years group. The number of IAAs ranged from 1 to 9 (median 3). A predominance of low stages (I/II) (11.2% and 49%, respectively) was observed in comparison with high stages (III/IV) (28.6% and 11.2%, respectively). Similarly, 54.1% of patients were located in the favorable-risk group. Extranodal disease was observed in 11.2% (11/98) of cases. The main clinical characteristics of the patients are summarized in Table I.

Nodular sclerosis (NS) was the predominant histological subtype (85.1%) (Table II and Figure 1), with 62.8% of cases having NS-GI and 37.2% having NS-GII. CD30 and CD15 were expressed by most cases, whereas CD20 was positive in only 25/94

Table I. Summary of associations between clinical characteristics and event-free survival (EFS) in cases of Hodgkin lymphoma.

Variable	Cases analyzed	Cases with complete follow-up	EFS (%)	Univariate analysis
<b>Age (years)</b>				
Median (range)	14 (3-18)			
≤10	29/104 (27.9%)	25/93	72.0	No (p=0.59)
>10	75/104 (72.1%)	68/93	77.9	
<b>Sex</b>				
Male	68/104 (65.4%)	59/93	74.6	No (p=0.67)
Female	36/104 (34.6%)	34/93	79.4	
<b>Number of sites</b>				
Median (range)	3 (1-9)			
≤4	58/97 (59.8%)	55/91	83.6	Borderline (p=0.083)
>4	39/97 (40.2%)	36/91	69.4	
<b>Mediastinal mass</b>				
Yes	64/98 (65.3%)	59/92	78.0	No (p=0.90)
No	34/98 (34.7%)	33/92	75.8	
<b>Stage</b>				
I	11/98 (11.2%)	10/92	90.0	No (p=0.15)
II	48/98 (49.0%)	44/92	79.5	
III	28/98 (28.6%)	27/92	77.8	
IV	11/98 (11.2%)	11/92	54.5	
<b>Extranodal site</b>				
Yes	11/98 (11.2%)	11/92	54.5	Yes (p=0.032)
No	87/98 (88.8%)	81/92	80.2	
<b>B-symptoms</b>				
Yes	51/98 (52%)	48/92	75.0	No (p=0.82)
No	47/98 (48%)	44/92	79.5	
<b>Risk group</b>				
Favorable	53/98 (54.1%)	49/92	81.6	No (p=0.21)
Unfavorable	45/98 (45.9%)	43/92	72.1	

(26.6%) (Table III and Figure 1). Analysis of the p53/p21 balance revealed 37/78 (47.4%) cases with a non-functional p53 pathway. It is worth noting that all p53 +/p21 - (pattern IV) showed p53 accumulation in ≥75% of the cells. Bcl2 was positive in 44/84 (52.4%) patients, while a high PI (Ki67 > 50%) was observed in 53/87 (60.9%) cases (Table III).

EBV RNA (EBER) was detected in H/RS cells in 43/98 patients (43.9%), with LMP1 expression ranging from 10 to > 75% H/RS cells (Table II and Figure 1).

*Therapeutic response*

Response to treatment was evaluated in 93 patients; 71 cases (76.3%) had finished the treatment and did not relapse, while 18 (19.35%) relapsed after the end of the treatment and four (4.35%) showed disease

Table II. Summary of associations between histological characteristics and Epstein–Barr virus (EBV) status and event-free survival (EFS) in cases of Hodgkin lymphoma.

Variable	Cases analyzed	Cases with complete follow-up	EFS (%)	Univariate analysis
<b>Histopathological diagnosis*</b>				
Nodular sclerosis	86/101 (85.1%)	80/90	76.3	No ( $p = 0.66$ )
Mixed cellularity	10/101 (9.9%)	7/90	71.4	
Lymphocyte-depleted	5/101 (5.0%)	3/90	100.0	
<b>Grade of nodular sclerosis (BNLI)</b>				
I	54/86 (62.8%)	50/80	72.0	No ( $p = 0.18$ )
II	32/86 (37.2%)	30/80	83.3	
<b>Risk of nodular sclerosis</b>				
Low risk	48/86 (55.8%)	45/80	75.6	No ( $p = 0.67$ )
High risk	38/86 (44.25%)	35/80	77.1	
<b>Number of H/RS cells</b>				
Median (range)	64 (2–713)			
≤64	50/101 (49.5%)	46/90	84.1	Borderline ( $p = 0.070$ ) <sup>†</sup>
>64	51/101 (50.5%)	44/90	69.6	
<b>Number of mitoses</b>				
Median (range)	2 (0–51)			
≤10	89/101 (88.1)	81/90	75.3	No ( $p = 0.36$ )
>10	12/101 (11.9)	9/90	88.9	
<b>Number of eosinophils</b>				
Median (range)	36 (0–3600)			
<36	53/102 (52.0%)	47/91	76.6	No ( $p = 0.91$ )
≥36	49/102 (48.05)	44/91	77.3	
<b>EBV association</b>				
Yes	43/98 (43.9%)	36/88	86.1	Borderline ( $p = 0.082$ )
No	55/98 (56.15)	52/88	69.2	

\*One case with diagnosis performed in the bone marrow biopsy.

<sup>†</sup>Significance valid only for high-risk patients.

BNLI, British National Lymphoma Investigation; H/RS, Hodgkin/Reed–Sternberg.

progression during treatment. Median length of follow-up was 68 months (1–129 months; the last patient included had 27 months of follow-up). The OS at 24 and 60 months was 95% and 88%, respectively; the EFS for the same periods was 86% and 78% (Figure 2). No differences in EFS and OS were observed in patients treated with ABVD and HD90 protocols ( $p = 0.98$  and  $p = 0.7$ , respectively).

- In the univariate analysis, extranodal disease, leukopenia, and Bcl2-positivity in the favorable-risk group impacted negatively on EFS ( $p = 0.032$ ,  $p = 0.041$ , and  $p = 0.048$ , respectively) (Tables I, III, and IV); leukopenia and extranodal disease maintained the prognostic impact in Cox regression (95% confidence interval [CI] 0.10–0.90,  $p = 0.023$ ; and 95% CI 0.11–0.95,  $p = 0.025$ , respectively) (Table V). High number (>4) of IAAs and lack of EBV in H/RS cells showed a borderline association with an unfavorable clinical response in the univariate analysis ( $p = 0.083$  and  $p = 0.082$ , respectively) (Tables I and II).

*Association and clustering of clinical and biological variables*

With the aim of determining whether clinical and histological/IHC variables routinely assessed in HL

patients could be associated with distinct subsets of aggressive disease (stage, risk group, B-symptoms, number of IAAs, mediastinal mass, NS grade, and NS risk), univariate analyses were carried out, and are summarized in Tables SI and SII (see ‘Appendix’). After that, multivariate analyses were used to confirm the associations observed in the univariate analyses.

Patients with low (I/II) and high stages (III/IV) differed in biological characteristics (Tables SI and SII). A high PI was shown to be associated with low-stage disease in multivariate analysis ( $p = 0.005$ ) (Table VI). Presence of B-symptoms was significantly associated with a very high PI (>75% Ki67 + H/RS cells) and high LDH levels, in univariate and multivariate analysis ( $p = 0.027$  and  $p = 0.001$ , respectively) (Tables SI, SII, and VI).

A high number of IAAs was associated with  $\beta_2$ -microglobulin levels in multivariate analysis ( $p = 0.029$ ) (Tables SI and VI). The presence of a mediastinal mass was associated with leukopenia, NS grade, and NS risk in multivariate analysis ( $p = 0.048$ ,  $p = 0.025$ , and  $p = 0.046$ , respectively) (Tables SI and VI). The presence of extranodal disease was related to a high number of eosinophils (>36/10 hpf) and a low PI (Ki67 < 50%) in univariate and multivariate analyses ( $p = 0.035$  and  $p = 0.024$ , respectively) (Tables SII and VI).

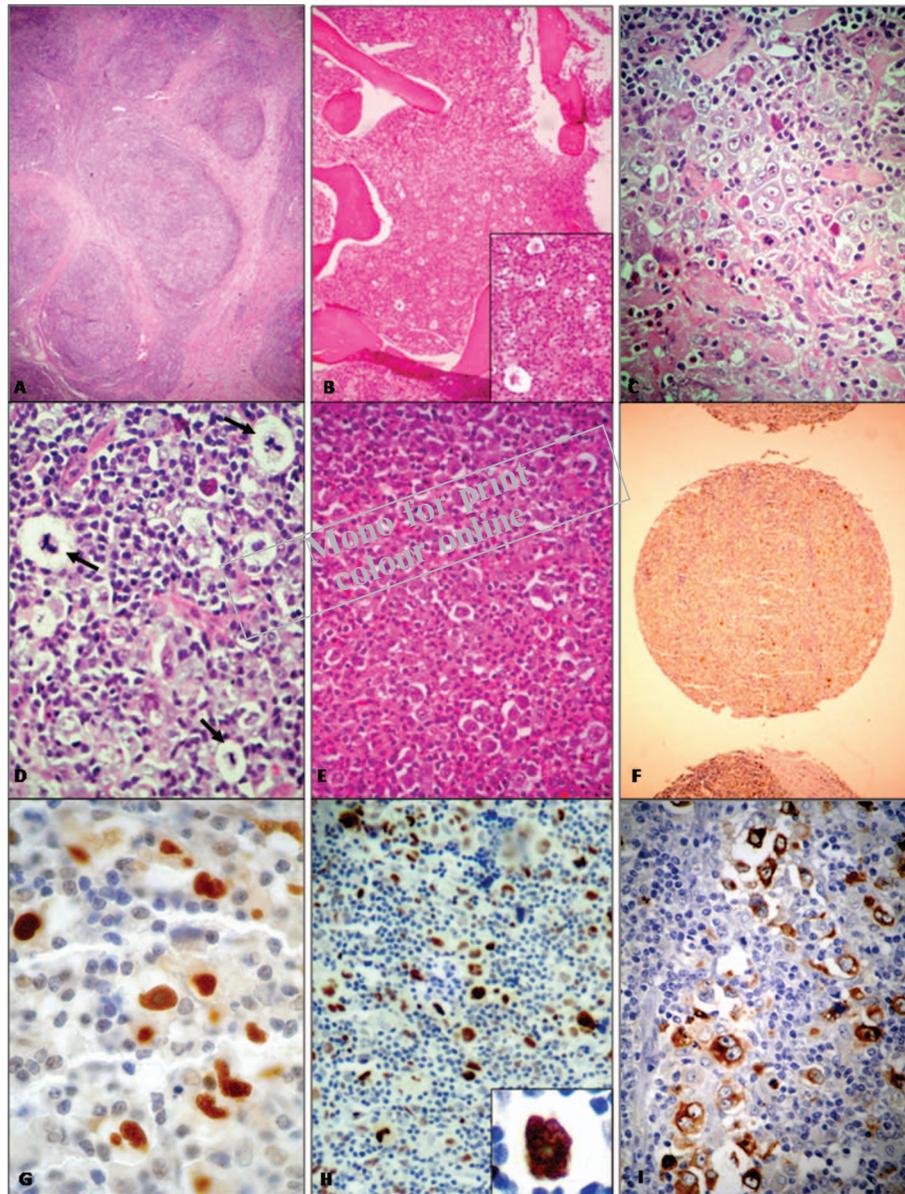


Figure 1. Histological and immunohistochemical characteristics. (A) Nodular sclerosis (NS) grade II (original magnification,  $\times 40$ ). (B) Bone marrow biopsy showing infiltrating HL ( $\times 40$ ). In detail, H/RS cells ( $\times 400$ ). (C) Case with high number of H/RS cells ( $\times 400$ ). (D) Case with high number of mitotic H/RS cells (arrow) ( $\times 400$ ). (E) Case with high number of eosinophils ( $\times 400$ ). (F) TMA slide, anti-MIB-1 (Ki67) antibody. Brown immunostaining in H/RS cell nuclei ( $\times 40$ ). (G) Case with p53 overexpression ( $\times 40$ ). (H) Case with p21 expression ( $\times 100$ ). In detail, Hodgkin cell ( $\times 400$ ). (I) Immunorexpression of LMP1 in H/RS cells of an EBV-associated HL case ( $\times 400$ ).

BNLI NS-GII was associated with several variables, of which only the number of eosinophils showed statistical significance in multivariate analysis ( $p = 0.033$ ) (Tables SII and VI). When considering the new NS grading system, the absence of EBV in neoplastic cells characterized NS high-risk patients in the multivariate analysis (Tables SII and VI). Although some differences were observed in NS grade and risk (26/32 NS-GII cases were classified as NS-HR, 42/54 NS-GI cases as NS-LR), these variables were statistically correlated ( $p < 0.0005$ ).

Since univariate and multivariate analyses showed a non-random distribution of clinical, histological,

immunohistochemical, and EBV characteristics, a hierarchical cluster analysis was performed, which identified two main clusters (Figure 3). Cluster I was mainly composed of high-risk patients and cell cycle and apoptosis features, associated with the NS subtype. Cluster II included a group of variables involving low-risk patients, B-cell differentiation (CD20 expression), EBV, and low-risk NS.

## Discussion

In this study, we present results for a risk-adapted, homogeneously treated group of patients, who

achieved survival rates comparable to those obtained in developed countries [1,25–27] and in other regions of Brazil [3,28]. In this group, we identified a suite of biological markers associated with clinical characteristics that may underlie disease aggressiveness in HL. As largely described in previous studies, we observed a lack of impact of those factors on survival. In fact, in Cox regression, only extranodal involvement and leukopenia maintained independent prognostic impact. Extranodal involvement is an established prognostic factor [29,30], but, different from previous studies [17,18,31], we observed that leukopenia, and not leukocytosis, at diagnosis exhibited an independent prognostic impact. No correlation was detected between leukopenia and extranodal disease and/or bone marrow involvement.

Although clinical stage has been considered a classical prognostic factor, in this pediatric series we did not observe any association with EFS, in agreement with previous studies [5,29,31,32]. In our group, high stages (III/IV) were associated with low PI, and cases with a high proliferating cell fraction exhibited low stages. Conflicting reports exist on the association between PI and stage [33,34]. Our results confirm the findings of Dinand *et al.* [35], suggesting that in children, HL with high PI could represent a less aggressive disease.

The disease risk group also showed no prognostic impact in this series. Although associations were observed in the univariate analysis among disease risk groups and many clinical, histological, and immunohistochemical variables, only Bcl2-positivity maintained a trend of association with unfavorable-risk group in the multivariate analysis. Bcl2 is an anti-apoptotic protein, which was shown to be associated with HL worst outcome by several authors [17–19].

The presence of B-symptoms is an example of a classical prognostic factor that lost the capacity to predict relapse in many series [5]. In multivariate analysis, we observed that the absence of B-symptoms was associated with very high PI and low LDH levels. It can be hypothesized that the cycling fraction of H/RS lost a ‘differentiation-like status,’ with a consequent down-regulation of the expression of B-symptom-associated cytokines. In normal fibroblasts, the proliferative status defines an ‘immature’ cell moment, which stops collagen production; conversely, differentiated, not dividing, cells are able to produce large collagen amounts [36,37]. In that sense, the association between extranodal involvement and low PI would suggest that a low proliferative activity is necessary for acquisition of an aggressive disease phenotype by H/RS cells.

The presence of a mediastinal mass had no prognostic impact, as was previously reported in

HL [3,31,38]. However, as observed in adult HL [15], in this pediatric series, grade II and high-risk NS were associated with mediastinal masses, reinforcing the idea that NS grade and risk reflect an important aspect of disease aggressiveness [6,14,15]. In fact, the present analysis showed that grade II NS was associated with variables likely reflecting tumor burden, such as high number of mitoses and p53-positivity, suggesting that loss of functional p53, and consequently perpetuation of the cell-cycle and propagation of genetic defects, would favor the spread of H/RS cells and hence a more disseminated disease [8]. NS grade II, as well as extranodal disease, was also associated with a high number of intratumoral eosinophils, which can contribute to the proliferative stimulation of CD30+H/RS cells by CD30 ligand [39], reinforcing the idea that stimulation of H/RS cells by the tumor microenvironment may have an important role in unfavorable disease phenotype acquisition.

The new grading system of NS proposed by von Wasielewski *et al.* [15] showed no EFS impact in this pediatric series. However, we observed that high-risk NS was associated with features of a more aggressive disease, such as the presence of a mediastinal mass, higher number of neoplastic cells, and p53 accumulation. An important and not yet described characteristic was the association between low-risk NS and presence of EBV ( $p=0.014$ ). The von Wasielewski grading system is based on characteristics of the tumor microenvironment, such as eosinophilia and lymphocyte depletion, as well as H/RS cell atypia, suggesting that, in H/RS cells, EBV is able to modulate the composition of the tumor microenvironment.

Moreover, our cluster analysis, in addition to distinguishing one group that included high-risk patients and characteristics associated with cell-cycle and proliferative status, identified a clustering of mixed cellularity (MC) and low-risk NS patients, as well as B-cell differentiation characteristics associated with EBV. Chetaille *et al.* [11], in a study combining expression profiles and microenvironment composition, disclosed a pattern of ‘inflammatory’ Th1 microenvironment and expression of innate immunity and antiviral genes in EBV-associated cases, indicating that, in HL, EBV actively influences tumor microenvironment by recruiting antiviral responses. This is in line with our results on the association of EBV with low histological aggressiveness and with a trend to a better therapeutic response in EBV+ cases.

Thus, at present, it is well recognized that with sufficiently intensive HL treatment, the prognostic impact of many variables such as age-group [30],

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

Table III. Summary of associations between immunohistochemical characteristics at diagnosis and event-free survival (EFS) in cases of Hodgkin lymphoma.

Variable	Cases analyzed	Cases with complete follow-up	EFS (%)	Univariate analysis
<b>CD30</b>				
Positive	85/92 (92.4%)	75/82	78.7	No ( $p=0.68$ )
Negative	7/92 (7.6%)	7/82	71.4	
<b>CD20</b>				
Positive	25/94 (26.6%)	22/84	81.8	No ( $p=0.62$ )
Negative	69/94 (73.4%)	62/84	77.4	
<b>Bcl2</b>				
Positive	44/84 (52.4%)	39/76	69.2	Yes ( $p=0.048$ )*
Negative	40/84 (47.6%)	37/76	78.4	
<b>p53</b>				
Positive	36/91 (39.6%)	35/82	82.9	No ( $p=0.12$ )
Negative	55/91 (60.4%)	47/82	70.2	
<b>p21</b>				
Positive	43/85 (50.6%)	39/77	76.0	No ( $p=0.48$ )
Negative	42/85 (49.4%)	38/77	71.1	
<b>p53-functional</b>				
Yes	43/85 (50.6%)	39/77	76.0	No ( $p=0.48$ )
No	42/85 (49.4%)	38/77	71.1	
<b>Ki67</b>				
$\geq 50\%^\dagger$	53/87 (60.9%)	48/78	75.0	No ( $p=0.80$ )
$< 50\%^\dagger$	34/87 (39.1%)	30/78	76.7	

\*Significance in low-risk patients.

<sup>†</sup>Ki67 staining in Hodgkin and Reed–Sternberg cells.

histological subtype [5], NS grade [6], and CD20 expression [40] are disappearing. However, our results show the existence of histological, cell-cycle, and viral factors related to aggressive subsets of pediatric HL at diagnosis, which could reflect differences in disease biology with a potential impact on clinical behavior.

In a recent study of a different Brazilian pediatric series [3], we showed that the presence of  $\geq 4$  IAAs, which may be a surrogate indicator of tumor burden, not included in the classical Ann Arbor staging system, was associated with an unfavorable outcome. We then performed a ‘*post hoc*’ re-stratification based on the combination of classical staging criteria and the number of IAAs. Most patients with late effects were located in the original unfavorable-risk group (70%); however, a significant number of them (45%), reallocated from the original unfavorable-risk group to a favorable-risk group, exhibited late effects. In general terms, these results showed that a subgroup of patients with better prognosis can be identified among the unfavorable-risk patients, based on tumor burden or aggressiveness characteristics, and suggested that the main negative consequence of tailoring chemotherapy based only on the stage and/or risk group is the overtreatment of a group of

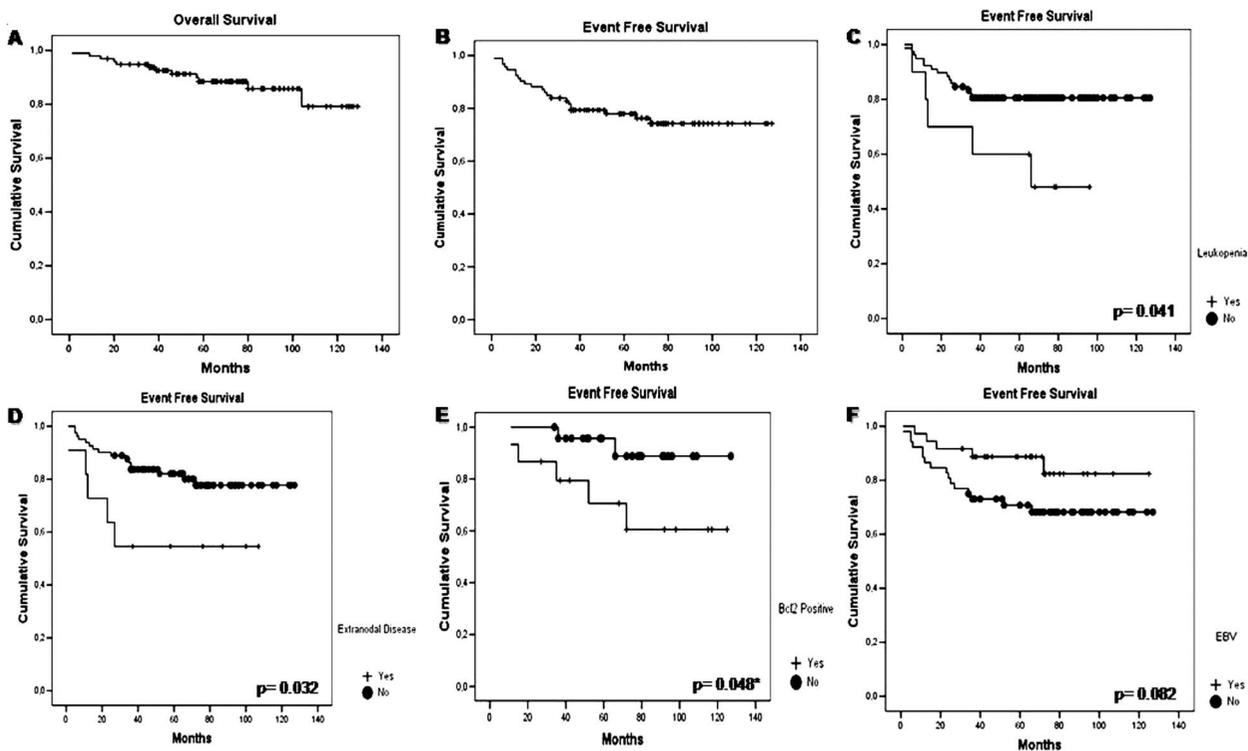


Figure 2. (A) Overall survival of patients with HL. (B) Event-free survival (EFS) of patients with HL. (C) EFS according to the presence of leukopenia. (D) EFS according to the presence of extranodal disease. (E) EFS according to the expression of Bcl2 in Hodgkin and Reed–Sternberg cells ( $\geq 10\%$ ) in the low-risk group of patients. \*Statistical significance only for low-risk patients. (F) EFS according to Epstein–Barr virus association.

Table IV. Summary of associations between laboratory data at diagnosis and event-free survival (EFS) in cases of Hodgkin lymphoma.

Variable	Cases analyzed	Cases with complete follow-up	EFS (%)	Univariate analysis
<b>Leukopenia</b>				
Yes	11/95 (11.6%)	10/92	50.0	Yes ( $p = 0.041$ )
No	84/95 (88.4%)	82/92	79.3	
<b>Lymphopenia</b>				
Yes	25/95 (26.3%)	23/88	78.3	No ( $p = 0.90$ )
No	70/95 (73.7%)	65/88	76.9	
<b>Anemia</b>				
Yes	67/96 (69.8%)	61/89	72.1	No ( $p = 0.10$ )
No	29/96 (30.2%)	28/89	89.3	
<b>Lactate dehydrogenase</b>				
High	40/89 (44.9%)	36/83	72.2	No ( $p = 0.55$ )
Normal	49/89 (55.1%)	47/83	78.7	
<b>Erythrocyte sedimentation</b>				
High	54/69 (78.3%)	53/67	77.4	No ( $p = 0.80$ )
Normal	15/69 (21.7%)	14/67	78.6	
<b><math>\beta_2</math>-Microglobulin</b>				
High	37/46 (63.8%)	36/57	75.0	No ( $p = 0.15$ )
Normal	21/46 (36.2%)	21/57	90.5	

Table V. Cox regression of variables influencing event-free survival in pediatric Hodgkin lymphoma series.

Variable	Hazard ratio, exp( $\beta$ )	Significance, $p$ -value	95% Confidence interval	
			Lower	Upper
Extranodal disease	0.29	0.025	0.10	0.85
Leukopenia	0.28	0.023	0.09	0.83
Bcl2-positivity	0.63	0.35	0.24	1.65

patients stratified as advanced-disease, but having a less aggressive disease. We are aware that with our results from a retrospective study including a relatively small number of patients, we are not able to suggest an algorithm of risk assessment that incorporates disease aggressiveness characteristics. For that purpose, it would be necessary to prospectively quantify, in frequency and prognostic impact, the group of less aggressive HL amidst the advanced/high-risk disease (for instance, low-risk NS and EBV+ patients) and, vice versa, the group of aggressive disease (for instance, patients with mediastinal mass and p53 accumulation) in the low-stages/risk patients. This information could be useful for planning a decrease of treatment intensity without reducing the efficacy of current therapeutic strategies for pediatric HL.

**Declaration of interest:** This work was supported by the Swissbridge Foundation (Switzerland), a

Table VI. Multivariate analysis of significant biological characteristics with respect to clinical and histological markers of aggressiveness.

Variable	$p$ -Value	95% Confidence interval	
		Lower bound	Upper bound
<b>Stage</b>			
Age group	0.44	-0.27	0.62
Proliferative index	0.005	0.18	0.98
p21 $\geq 50\%$	0.48	-0.52	0.25
EBV*	0.065	-0.02	0.74
<b>Risk group</b>			
Age group	0.77	-0.69	0.52
Anemia	0.40	-0.58	0.24
Erythrocyte sedimentation rate	0.68	-0.60	-0.40
$\beta_2$ -Microglobulin level	0.22	-0.63	0.15
Number of neoplastic cells/10 hpf <sup>†</sup>	0.10	-0.70	0.07
Nodular sclerosis grade	0.37	-0.20	0.53
CD20	0.61	-0.37	0.62
CD30	0.45	-1.64	0.75
Bcl2	0.064	-0.72	0.02
<b>B-symptoms</b>			
Lactate dehydrogenase level	0.001	0.17	0.60
Proliferative index	0.027	-0.48	-0.03
<b>Number of IAAs<sup>‡</sup></b>			
Lactate dehydrogenase level	0.85	-0.30	0.25
Anemia	0.97	-0.31	0.30
Erythrocyte sedimentation rate	0.14	-0.08	0.58
$\beta_2$ -Microglobulin level	0.029	0.39	0.69
<b>Mediastinal mass</b>			
Age group	0.27	-0.57	0.15
Leukopenia	0.048	-0.89	-0.00
$\beta_2$ -Microglobulin level	0.22	-0.11	-0.47
Nodular sclerosis grade	0.025	-0.82	-0.06
Nodular sclerosis risk	0.046	0.00	0.75
EBV-association	0.098	-0.54	0.04
<b>Extranodal involvement</b>			
Number of eosinophils/10 hpf	0.035	-0.30	-0.01
Proliferative index	0.024	-0.32	-0.23
<b>Nodular sclerosis grade</b>			
Age group	0.073	-0.29	0.62
Lymphopenia	0.080	-0.49	0.02
Mediastinal mass	0.92	-0.24	0.27
Risk group	0.80	-0.23	0.29
Number of eosinophils/10 hpf	0.033	0.02	0.51
p53 accumulation	0.066	-0.57	0.01
p21	0.67	-0.23	0.36
<b>Nodular sclerosis risk</b>			
Age group	0.22	-0.11	0.49
Mediastinal mass	0.96	-0.26	0.25
Risk group	0.13	-0.05	0.43
Mitosis/10 hpf <sup>§</sup>	0.38	-0.67	0.24
EBV	0.014	0.06	0.58

\*EBV, Epstein-Barr virus presence in Hodgkin/Reed-Sternberg (H/RS) cells.

<sup>†</sup>hpf, high-power field.

<sup>‡</sup>IAAs, involved anatomic areas.

<sup>§</sup>Number of mitotic H/RS cells in 10 high-power fields.

Brazil-Argentina collaborative project (CAPES/Min-CyT), and by the public Brazilian Agencies CNPq and FAPERJ.

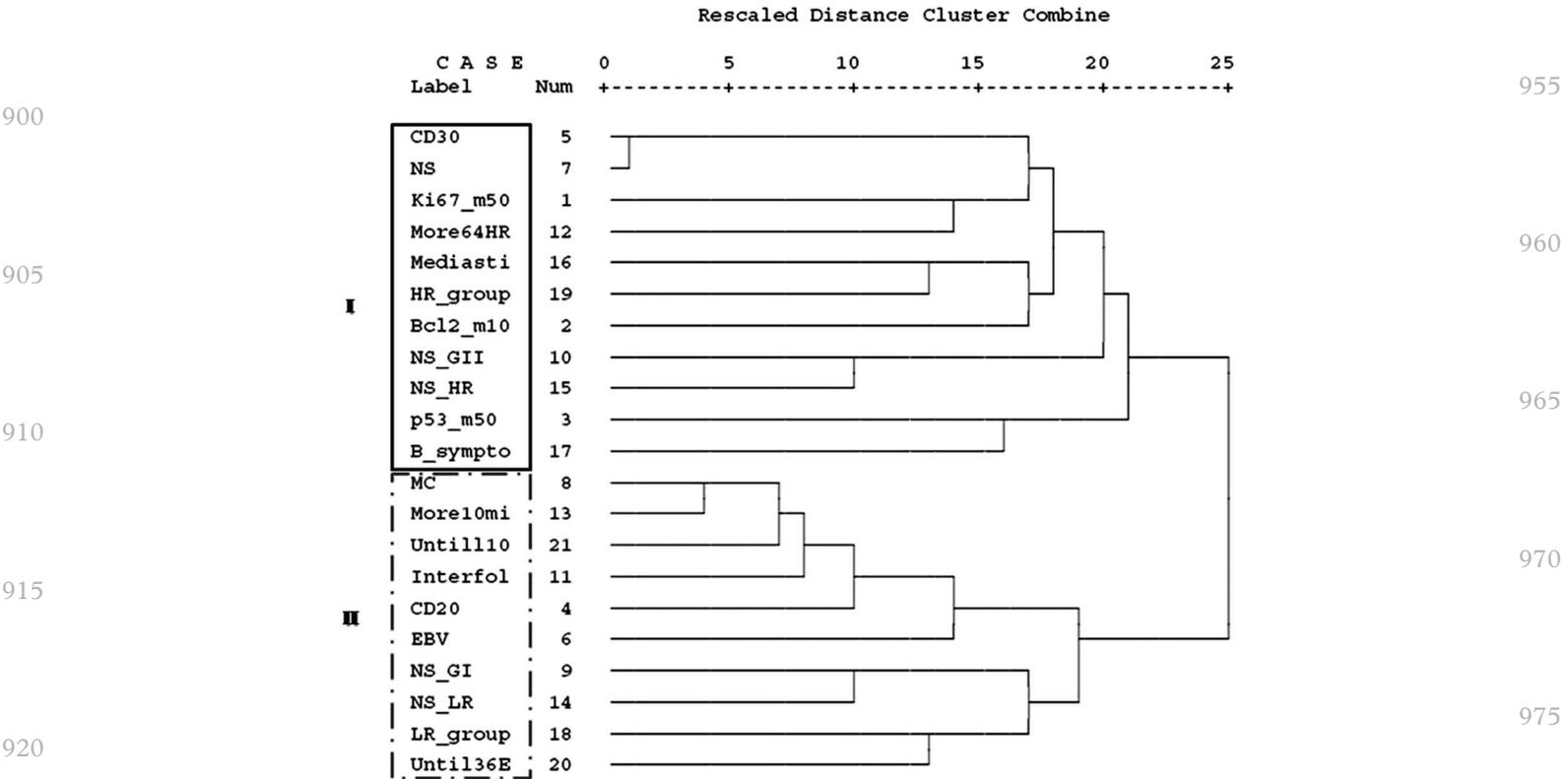


Figure 3. Dendrogram using average linkage obtained by hierarchical cluster analysis of clinical and morphological variables. Clusters are identified by brackets, and the two main clusters (I and II) by open rectangles. NS, nodular sclerosis; Ki67\_m50,  $\geq 50\%$  Ki67 + neoplastic cells; More64HR,  $\geq 64$  Hodgkin and Reed–Sternberg cells in 10 high-power fields; Mediasti, presence of mediastinal mass; HR\_group, high-risk group; Bcl2\_m10,  $\geq 10\%$  Bcl2 + neoplastic cells; NS\_GII, nodular sclerosis grade II, according to BNLI; NS\_HR, nodular sclerosis high-risk; p53\_m50,  $\geq 50\%$  p53 + neoplastic cells; B\_sympto, B-symptoms; MC, mixed cellularity; More10mi,  $\geq 10$  neoplastic cells in mitosis; Untill10, age  $\leq 10$  years; Interfol, interfollicular pattern; EBV, Epstein–Barr virus; NS\_GI, nodular sclerosis grade I, according to BNLI; NS\_LR, nodular sclerosis low-risk; LR\_group, high-risk group; Until36E,  $\leq 36$  eosinophils in 10 high-power fields.

## References

- Thomson AB, Wallace WH. Treatment of paediatric Hodgkin's disease. A balance of risks. *Eur J Cancer* 2002;38:468–477.
- Diehl V, Klimm B, Re D. Hodgkin lymphoma: a curable disease: what comes next? *Eur J Haematol Suppl* 2005;(66):6–13.
- Morais A, Barros MH, Hassan R, Morais VL, Muniz MT. Number of involved anatomic areas as a risk predictor in pediatric Hodgkin's lymphoma: a retrospective study. *J Pediatr (Rio J)* 2009;85:236–242.
- Hodgson DC, Hudson MM, Constine LS. Pediatric Hodgkin lymphoma: maximizing efficacy and minimizing toxicity. *Semin Radiat Oncol* 2007;17:230–242.
- Hasenclever D. The disappearance of prognostic factors in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 2002;13:75–78.
- van Spronsen DJ, Vrints LW, Hofstra G, Crommelin MA, Coebergh JW, Breed WP. Disappearance of prognostic significance of histopathological grading nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972–92. *Br J Haematol* 1997;96:322–327.
- Bai M, Papoudou-Bai A, Kitsoulis P, et al. Cell cycle and apoptosis deregulation in classical Hodgkin lymphomas. *In Vivo* 2005;19:439–453.
- Montalbán C, García JF, Abraira V, et al. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol* 2004;22:1664–1673.
- Ambinder RF. Epstein-Barr virus and Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007:204–209.
- Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol* 2008;173:195–204.
- Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood* 2009;113:2765–3775.
- Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* 2009;114:3367–3375.
- Stein H, Delsol G, Pileri S, Weiss LM, Poppema S, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma. In: Swerdlow SH, Campos E, Harris NL, et al. editors. *World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues*. Lyon: IARC Press; 2008. pp 326–329.
- MacLennan KA, Bennett MH, Tu A, et al. Relationship of histopathologic features to survival and relapse in nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 1659 patients. *Cancer* 1989;64:1686–1693.
- von Wasielewski S, Franklin J, Fischer R, et al. Nodular sclerosing Hodgkin disease: new grading predicts prognosis in

- intermediate and advanced stages. *Blood* 2003;101:4063–4069.
16. Zhou XG, Sandvej K, Li PJ, et al. Epstein-Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV-related lymphoma. *Cancer* 2001;92:1621–1631.
  17. Smolewski P, Robak T, Krykowski E, et al. Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. *Clin Cancer Res* 2000;6:1150–1160.
  18. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood* 2002;100:3935–3941.
  19. Sup SJ, Alemañy CA, Pohlman B, et al. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol* 2005;23:3773–3779.
  20. Chilosi M, Doglioni C, Magalini A, et al. p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. *Blood* 1996;88:4012–4020.
  21. Chabay P, Pesce P, De Matteo E, Lombardi MG, Rey G, Preciado MV. No influence of bcl-2, p53 and p21/waf1 protein expression on the outcome of pediatric Hodgkin lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28:552–558.
  22. Hassan R, White LR, Stefanoff CG, et al. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagn Pathol* 2006;1:17–22.
  23. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–481.
  24. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank-order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:163–170.
  25. Schwartz CL. Special issues in pediatric Hodgkin's disease. *Eur J Haematol* 2005;75:55–62.
  26. Oberlin O, Leverger G, Pacquement H, et al. Low-dose radiation therapy and reduced chemotherapy in childhood Hodgkin's disease: the experience of the French Society of Pediatric Oncology. *J Clin Oncol* 1992;10:1602–1608.
  27. Schellong G, Pötter R, Brämswig J, et al. High cure rates and reduced long-term toxicity in pediatric Hodgkin's disease: the German-Austrian multicenter trial DAL-HD-90. The German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Study Group. *J Clin Oncol* 1999;17:3736–3744.
  28. Viani GA, Castilho MS, Novaes PE, et al. Chemotherapy followed by low dose radiotherapy in childhood Hodgkin's disease: retrospective analysis of results and prognostic factors. *Radiat Oncol* 2006;1:38.
  29. Claviez A, Tiemann M, Peters J, Kreipe H, Schneppenheim R, Parwaresch R. The impact of EBV, proliferation rate, and Bcl-2 expression in Hodgkin's disease in childhood. *Ann Hematol* 1994; 68:61–66.
  30. Oguz A, Karadeniz C, Okur FV, et al. Prognostic factor and treatment outcome in childhood Hodgkin disease. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45:670–675.
  31. Smith RS, Chen Q, Hudson MM, et al. Prognostic factors for children with Hodgkin's disease treated with combined-modality therapy. *J Clin Oncol* 2003;10:2026–2033.
  32. Chabay PA, Barros MH, Hassan R, et al. Pediatric Hodgkin lymphoma in 2 South American series: a distinctive epidemiologic pattern and lack of association of Epstein-Barr virus with clinical outcome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:285–291.
  33. Wang J, Taylor CR. Apoptosis and cell cycle-related genes and proteins in classical Hodgkin lymphoma: application of tissue microarray technique. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2003;11:206–213.
  34. Tiemann M, Claviez A, Lüders H, et al. Proliferation characteristics in pediatric Hodgkin's lymphoma point to a cell cycle arrest in the G(1) phase. *Mod Pathol* 2005;18:1440–1447.
  35. Dinand V, Malik A, Unni R, Arya LS, Pandey RM, Dawar R. Proliferative index and CD15 expression in pediatric classical Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer* 2008;50:280–283.
  36. Desmoulière A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003;83:1689–1707.
  37. Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol* 2009;40:1365–1376.
  38. Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, et al. Prognostic factors in advanced stage Hodgkin's lymphoma: the significance of the number of involved anatomic sites. *Eur J Haematol* 2001;67:279–288.
  39. Pinto A, Aldinucci D, Gloghini A, et al. Human eosinophils express functional CD30 ligand and stimulate proliferation of a Hodgkin's disease cell line. *Blood* 1996;88:3299–3305.
  40. Zander T, Wiedenmann S, Wolf J. Prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002;13:67–74.

Table S1. Epidemiologic, clinical, laboratory, histological, and immunohistochemical variables with significant or trend association in univariate analysis.

Stage	Sex		Age group		Leukopenia		Lymphopenia		Anemia		High LDH level*		High $\beta_2$ level†		High ESR level‡		Med. mass§		Risk group¶		
	Male	Female	≤10 years	>10 years	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	LR	HR	
I	-	-	7	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	9	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	-	-	6	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	-	-	3	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	25	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Value	-	-	0.02		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Risk group	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Favorable	-	-	19	34	-	-	8	41	30	20	-	-	16	16	25	13	-	-	-	-	-
Unfavorable	-	-	6	39	-	-	16	28	35	9	-	-	21	5	28	2	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	25	73	-	-	24	69	65	29	-	-	37	21	53	15	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Value	-	-	0.011		-	-	0.027		0.041		-	-	0.015		0.007		-	-	-	-	-
B-symptoms	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39	48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Value	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.042		-	-	-	-	-	-	-	-	-
IAAs**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
≤4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	14	18	2	23	1	-	-	-	-	-
>4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31	7	34	19	18	30	13	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	22	17	34	37	53	14	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Value	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64	29	38	48	0.004	0.012	-	-	-	-	-	-
Med. mass	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.027		0.014		-	-	-	-	-	-	-	-
Yes	-	-	11	53	4	7	-	-	-	-	-	-	30	9	41	7	-	-	-	-	-
No	-	-	14	20	59	27	-	-	-	-	-	-	7	11	13	7	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	25	73	63	34	-	-	-	-	-	-	37	20	54	14	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Value	-	-	0.010		0.035		-	-	-	-	-	-	0.005		0.058		-	-	-	-	-
Extranodal††	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Value	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(continued)

1180  
1185  
1190  
1195  
1200  
1205  
1210  
1215  
1220  
1225  
1230

Table SI. (Continued).

NS grade**	Sex		Age group		Leukopenia		Lymphopenia		Anemia		High LDH level*		High $\beta_2$ level†		High ESR level‡		Med. mass§		Risk group¶		
	Male	Female	≤10 years	>10 years	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	LR	HR	
I	38	16	17	37	-	-	8	41	-	-	-	-	-	-	-	-	30	23	34	18	
II	16	16	1	31	-	-	14	17	-	-	-	-	-	-	-	-	25	7	13	19	
<b>Total</b>	54	32	18	68	-	-	22	58	-	-	-	-	-	-	-	-	55	30	47	37	
<i>p</i> -Value	0.059		0.002		-		0.005		-		-		-		-		0.036		0.026		
NS risk§§																					
Low	34	14	14	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26	21	31	16	
High	20	18	4	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	9	16	21	
<b>Total</b>	54	32	18	68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55	30	47	37	
<i>p</i> -Value	0.083		0.035		-		-		-		-		-		-		0.044		0.037		

\*High lactate dehydrogenase level.

†High  $\beta_2$ -microglobulin level.

‡High erythrocyte sedimentation rate.

§Mediastinal mass.

¶Low-risk group (LR), high-risk group (HR).

\*\*Involved atonic areas.

††Extranodal disease.

\*\*Nodular sclerosis grade.

§§Nodular sclerosis risk.

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

Table SII. Epidemiologic, clinical, laboratory, histological, and immunohistochemical variables with significant or trend association in univariate analysis (continuation).

Stage	NS grade*		NS risk†		≤36 Eo‡		≥10 Mitoses§		≥64 H/RS¶		p53**		p21††		Func. p53‡‡		Ki67 ≥50%§§		Bcl2¶¶		EBV***		CD20		
	I	II	Low	High	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>p</i> -Value																									
Risk group																									
Favorable	34	13	-	-	-	-	-	-	30	31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	25	-	-	16	30
Unfavorable	18	19	-	-	-	-	-	-	29	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23	14	-	-	6	36
<b>Total</b>	52	32	-	-	-	-	-	-	49	46	-	-	-	-	-	-	-	-	39	39	-	-	22	66	
<i>p</i> -Value																									
B-symptoms																									
Yes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10#	36#	-	-	-	
No	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16#	19#	-	-	-	
<b>Total</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26#	55#	-	-	-	
<i>p</i> -Value																									
IAAs																									
≤4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
>4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>p</i> -Value																									
Med. mass																									
Yes	30	25	26	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
No	23	7	21	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Total</b>	53	32	47	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>p</i> -Value																									
	0.044		0.044																						

(continued)

1405  
1410  
1415  
1420  
1425  
1430  
1435  
1440  
1445  
1450  
1455

Table SII. (Continued).

	NS grade*		NS risk <sup>†</sup>	≤36 Eo <sup>‡</sup>		≥10 Mitoses <sup>§</sup>		≥64 H/RS <sup>¶</sup>		p53**	p21 <sup>††</sup>	Func. p53 <sup>**</sup>		Ki67 ≥50% <sup>§§</sup>		Bcl2 <sup>¶¶</sup>		EBV <sup>***</sup>		CD20	
	I	II		Yes	No	Yes	No	Yes	No			Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No
Extranodal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yes	-	-	-	2	9	-	-	-	-	-	-	-	-	3	8	-	-	-	-	-	-
No	-	-	-	47	38	-	-	-	-	-	-	-	-	47	23	-	-	-	-	-	-
<b>Total</b>	-	-	-	49	47	-	-	-	-	-	-	-	-	50	31	-	-	-	-	-	-
<i>p</i> -Value	-	-	-	0.021		-	-	-	-	-	-	-	-	0.011		-	-	-	-	-	-
NS grade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	-	32	22	1	53	-	-	12	35	-	-	17	26	-	-	30	23	34	18
II	-	-	-	12	20	7	25	-	-	19	10	-	-	19	10	-	-	25	7	13	19
<b>Total</b>	-	-	-	44	42	8	78	-	-	31	45	-	-	36	36	-	-	55	30	47	37
<i>p</i> -Value	-	-	-	0.051		0.002		-	-	0.001		-	-	0.031		-	-	0.026		0.002	
NS risk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Low	-	-	-	-	-	1	47	-	-	13	29	-	-	-	-	-	-	-	-	26	19
High	-	-	-	-	-	7	31	-	-	18	16	-	-	-	-	-	-	-	-	9	28
<b>Total</b>	-	-	-	-	-	8	78	-	-	31	45	-	-	-	-	-	-	-	-	35	47
<i>p</i> -Value	-	-	-	-	-	0.01		-	-	0.052		-	-	-	-	-	-	-	-	0.002	

\*Nodular sclerosis grade.

<sup>†</sup>Nodular sclerosis risk.

<sup>‡</sup>≤36 Eosinophils in 10 high-power fields.

<sup>§</sup>≥10 Mitoses in 10 high-power fields.

<sup>¶</sup>≥64 Hodgkin and Reed-Sternberg (H/RS) cells in 10 high-power fields.

\*\*p53-positive (≥50%).

<sup>††</sup>p21-negative (<50%).

<sup>‡‡</sup>Functional p53.

<sup>§§</sup>≥50% H/RS cells expressing Ki67.

<sup>¶¶</sup>Bcl2-positive.

<sup>\*\*\*</sup>Epstein-Barr virus in tumor cells.

#(See Table SI for other definitions.)

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

Research Article

# Disease patterns in pediatric classical Hodgkin lymphoma: a report from a developing area in Brazil

Mário Henrique M. Barros<sup>1,2\*</sup>, Rocio Hassan<sup>1</sup> and Gerald Niedobitek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Institute for Pathology, Unfallkrankenhaus Berlin, Berlin, Germany

\*Correspondence to:

Dr. Mário Henrique M. Barros,  
Bone Marrow Transplantation  
Center (CEMO), Instituto Nacional  
de Câncer—INCA, Praça Cruz  
Vermelha 23, 6° Andar, 20230-  
130 Rio de Janeiro, RJ, Brazil;  
Institute for Pathology,  
Unfallkrankenhaus Berlin,  
Warener Str. 7, 12683 Berlin,  
Germany.  
E-mail: mhbarros@inca.gov.br,  
mario.barros@ukb.de

## Abstract

**Epidemiological patterns established about 20 years ago, divided classical Hodgkin lymphoma (cHL) in three entities with regard to Epstein–Barr virus (EBV) status and histological subtypes and suggested different epidemiological patterns associated with degree of economic development. Here, we investigated histopathological features and EBV association in 100 consecutive pediatric cHL cases occurring in Rio de Janeiro (Brazil). Age at diagnosis ranged from 3 to 18 years (median 14 years) with 27% of cases  $\leq 10$  years. Unexpectedly, we did not observe an early childhood peak with most cases occurring in the  $>10$  years age group. Nodular sclerosis (NS) was the most frequent subtype (69%) and was more frequently observed in the  $>10$  years age group, followed by mixed cellularity (MC, 23%) which was distributed equally between age groups. EBV was identified in 44.8% of cases, without preferential association with age groups ( $\leq 10$  years vs.  $>10$  years). MC cases were independently associated with EBV infection of tumour cells ( $p = 0.045$ ) and with a CD4/CD20 ratio  $<1$  in the microenvironment ( $p = 0.014$ ). Our results suggest that a gradual shift from childhood peak to early adulthood peak may be observed in developing regions. The development of MC subtype may result from early exposure to EBV in the context of an impaired immune system reflected by a CD4/CD20 ratio  $<1$ . Conversely, it is possible that NS originates predominantly in the context of a better immune response against EBV and/or tumour antigens expressed in the neoplastic cells. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.**

Supporting information may be found in the online version of this article.

**Keywords:** Hodgkin lymphoma; tumour microenvironment; Epstein–Barr virus; childhood

Received: 23 December  
2010  
Revised: 18 January 2011  
Accepted: 19 January 2011

## Introduction

Classical Hodgkin lymphoma (cHL) is derived from B cells in the majority of cases and is classified according to the World Health Organization as nodular sclerosis (NS), mixed cellularity (MC), lymphocyte-depletion (LD) and lymphocyte-rich (LR) histological subtypes [1,2]. cHL is associated with Epstein–Barr virus (EBV) in a variable number of cases [3].

Armstrong *et al.* [4] proposed a 3-disease model based on age at presentation, histological type, and EBV association. The first entity is largely an EBV-associated disease of childhood, with higher incidence in developing countries and is usually of MC subtype. Development of cHL, in this case, is probably associated with early exposure to EBV infection. The second entity predominantly affects older adults, and is also usually of the MC subtype and EBV-associated. Its EBV association is likely to be related to EBV reactivation events. The third entity predominantly affects young adults, is more prevalent in developed countries, usually of NS subtype, and not EBV-associated.

Subsequently, three epidemiological patterns of the disease were proposed, according to socioeconomic level:

Pattern I is seen in poorly developed countries, showing an early childhood peak, and a predominance of MC subtype; Pattern II, observed in developing or transitional economies, displays both a childhood and a second decade peak, and equal frequencies of MC and NS subtypes; Pattern III is observed in developed countries and displays a third decade peak and a predominance of NS over other subtypes [5].

However, several lines of evidence suggest that these epidemiological patterns are not tight and that transitions may exist among the described forms of the disease. Burkitt lymphoma (BL), another EBV-associated lymphoma frequent in childhood, shows a similar scenario. In endemic regions (Equatorial Africa), BL is almost always EBV-associated (endemic BL) while in others regions EBV association ranges between 10% and 30% (sporadic BL). We have recently proposed that in Southeastern Brazil, childhood BL exhibits an intermediate pattern, in terms of EBV association and clinical features [6].

In this work, we have reviewed a series of cHL occurring in children and adolescent originating in a region of intermediate socio-economical development, and extend previous work [7] with the aim of discussing aspects of histopathogenesis and epidemiology of pediatric cHL.

## Materials and methods

### Patients and histology

One hundred consecutive children and adolescents (up to 18-year old) diagnosed with classical HL at the Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro (Southeastern Brazil), between 1999 and 2006, were included in this study, based on availability of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. All the patients were from Rio de Janeiro. The INCA is responsible for the treatment of the majority of children and adolescents with cancer in Rio de Janeiro. This study was approved by the INCA Ethics Committee (Prot. 37/05).

Diagnosis of cHL was established by morphological and immunohistological criteria, according to the WHO classification [2]. All cases were independently reviewed by two pathologists (M.H.M.B. and G.N.); the discordant cases were discussed at a double-head microscope until a consensus was obtained. A diagnosis of NS was rendered when capsular fibrosis, fibrous bands emanating from the lymph node capsule, and resulting nodularity were present at least in parts of the affected nodes [8].

### EBV determination and lymphocyte immunophenotyping

EBV infection of HRS cells was detected by LMP1 immunohistochemistry (IHC) and *in situ* hybridization with fluorescein-conjugated probes for the EBV-encoded RNAs (EBER-ISH), as previously described [3]. IHC for

the detection of CD4 (clone 1F6, Novocastra) and CD20 (clone L26, DakoCytomation) in infiltrating lymphocytes of the tumor microenvironment was performed as described [3]. The number of CD4 and CD20 lymphocytes was determined per 1 mm<sup>2</sup> using the image analysis software HISTO (Biomax, Elangen, Germany), as previously described [9]. Germinal centres, when present, were not considered.

## Results and discussion

The age at diagnosis ranged from 3 to 18 years (median 14 years) with 27% of cases  $\leq 10$  years. The male:female ratio was 1.7:1 (64 males and 36 females). EBV was associated with 43 of 96 (44.8%) informative cases.

NS was the most prevalent subtype (69%), followed by MC (23%), LR (2%), LD (1%) and 5 unclassifiable cases (Table 1).

MC subtype was similarly distributed in  $\leq 10$  years (12 of 23 cases) and  $> 10$  years age (11 of 23 cases) groups. By contrast, 83.1% (54/65) of NS cases were diagnosed in older children ( $p = 0.01$ ,  $\chi^2$ ; Table 1). With respect to the presence of EBV in neoplastic cells, no differential association was observed between age groups (Table 1). As expected, EBV was more prevalent in the MC cases (15 of 22 cases, 68.2%,  $p = 0.016$ ,  $\chi^2$ ), but NS cases were also frequently EBV-associated (26 of 67 cases, 38.8%; Table 1).

A significant correlation between EBV association and male gender was observed, similar to other studies [10,11]

**Table 1.** Clinical, histological and lymphocyte characteristics of pediatric classical Hodgkin lymphoma according Epstein–Barr virus and mixed cellularity status

	(%)	Epstein–Barr virus <sup>a</sup>		p-value	Histological subtypes		p-value
		Present (%)	Absent (%)		MC	Others	
Age (3–18 years, median 14)							
$\leq 10$ years	27/100 (27)	15/43 (34.9)	12/53 (22.6)	0.18	12/23 (55.2)	15/77 (19.5)	0.002
$> 10$ years	73/100 (73)	28/43 (65.1)	41/53 (55.2)		11/23 (47.8)	62/77 (80.5)	
Sex							
Male	64/100 (64)	33/43 (76.7)	28/53 (52.8)	0.015	16/23 (69.6)	48/77 (62.3)	0.6
Female	36/100 (36)	10/43 (23.3)	25/53 (47.2)		7/23 (30.4)	29/77 (37.7)	
Histopathological diagnosis							
Nodular sclerosis	69/100 (69)	26/43 (60.5)	41/53 (77.4)	0.019 <sup>b</sup>	NA	NA	NA
Mixed cellularity	23/100 (23)	15/43 (34.9)	7/53 (13.2)				
Lymphocyte-depleted	1/100 (1)	1/43 (2.3)	0/53 (0)				
Lymphocyte-rich	2/100 (2)	0/43 (0)	2/53 (3.8)				
Unclassifiable	5/100 (5)	1/43 (2.3)	3/53 (5.7)				
Nodular sclerosis grade							
Grade I	38/69 (55.1)	17/26 (65.4)	20/41 (48.8)	0.18	NA	NA	NA
Grade II	31/69 (44.9)	9/26 (34.6)	21/41 (51.2)				
CD4/CD20 ratio $< 1$ <sup>c,d</sup>							
Yes	48/81 (59.3)	23/34 (67.6)	24/45 (53.3)	0.1	18/21 (85.7)	30/60 (50)	0.005
No	33/81 (40.7)	11/34 (32.4)	21/45 (46.7)		3/21 (14.3)	30/60 (50)	

NA, not applicable.

<sup>a</sup>Epstein–Barr virus evaluable in 96/100 cases.

<sup>b</sup>Significance in the comparison between nodular sclerosis and mixed cellularity subtype.

<sup>c</sup>CD4/CD20 ratio assessable in 81/100 cases included in this study.

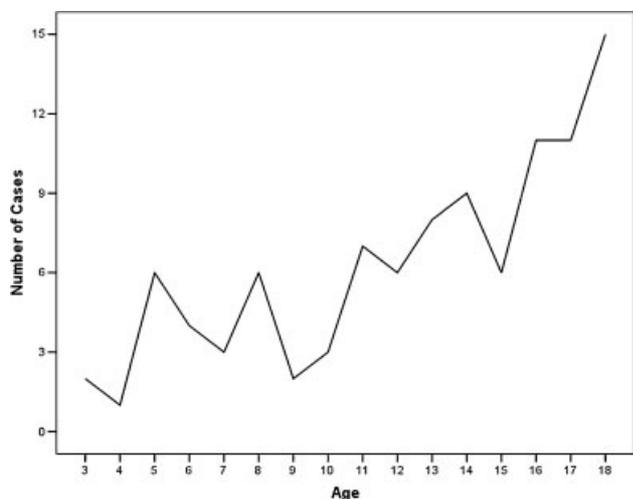
<sup>d</sup>CD4/CD20 ratio assessable in 79/96 cases evaluated for EBV status.

## Patterns of pediatric classical Hodgkin lymphoma

which was not secondary to histological distribution between male and female children. Recently, a differential expression of HLA class II by HRS cells in male and female patients with cHL has been described [11], which might be related to control of EBV infection and consequently might facilitate the development of EBV-associated cHL in male patients.

In poorly developed regions, pediatric cHL predominantly affects younger children ( $\leq 10$  years) (43.75–76.4%), is MC in the majority of cases (32.7–78.8%) and is commonly EBV-associated (48–100%) [12–27]. In developed countries, pediatric cHL affects adolescents (34.6–85%), is NS in the majority of cases (29.5–65%) and is less frequently EBV-associated (31–58%) [4,10,13,14,18,24,28–36] (Table S1 supplemental data). We investigated a series of pediatric cHL cases from a region with intermediate development. In contrast to cases from poorly developed areas, we observed more cases in the older group ( $>10$  years), a striking prevalence of NS histological type and an intermediate rate of EBV-association suggesting a pattern shift from that seen in poorly developed regions towards a developed region pattern. Of note, we observed a relatively high rate of EBV infection in HRS cells of NS cases (Table 1).

Interestingly, analysis of age distribution revealed that there were only relatively few cases occurring in children  $\leq 10$  year of age. Thus, we did not observe the expected peak in young children. Subsequently, the number of cases increased with age in direction of the peak, typically seen in young adults in Brazil and in developed countries [37,38] (Figure 1), and this shift was almost entirely due to an increase in NS cases. Therefore, we propose that pediatric cHL in Southeastern Brazil does not belong to one of the epidemiological pattern proposed by Armstrong *et al.* [4] and Harris [5], and is in marked contrast with the pediatric cHL from Northeastern Brazil (a less well-developed region) that shows EBV-association in about 87% of cases and prevalence of MC subtype characteristic of an epidemiological pattern I [39]. We propose that higher socioeconomical level observed in some regions

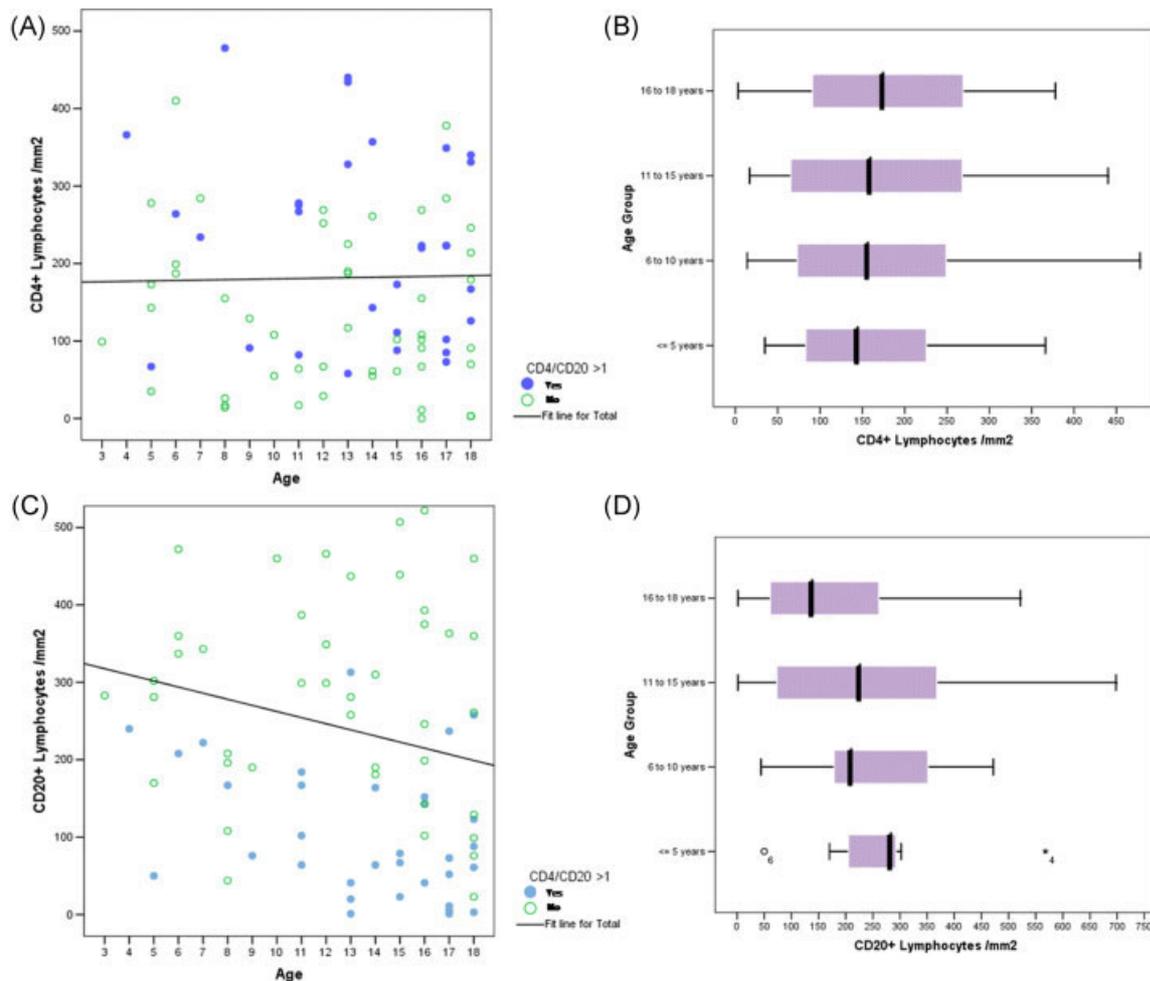


**Figure 1.** Line chart showing the distribution of the number of cases by age. There is an increase in the number of cases with age

in developing countries can promote a mix of cultural, environmental and health factors characterized by early EBV infection, an improving functional status of the immune system and a decrease of other infectious diseases in children, which may contribute to the development of cHL in adolescents. In fact, about 70% of children  $\leq 9$  years from Southeastern Brazil have antibodies against virus capsid antigen from EBV [40,41]. This would be the scenario where cHL displays a prevalence of NS, an intermediate frequency of EBV-association between rich and poor countries, and a higher frequency of EBV-associated NS cases, as observed in our patient series.

It has been demonstrated that in AIDS patients relatively higher numbers of peripheral blood CD4+ T cells are associated with an increased risk of developing cHL [42], suggesting that a certain minimal immune response may be required for the development of cHL. Furthermore, AIDS patients with higher numbers of CD4+ peripheral blood T cells preferentially develop NS while MC is more common at lower CD4 counts [42]. In addition, it has been shown that children display higher numbers of CD20+ lymphocytes in peripheral blood in relation to CD4+ lymphocytes when compared to adults [43,44]. Based on these observations we have speculated that the prevalence of cHL and the distribution of cHL histotypes may relate to the numbers of CD4+ and CD20+ lymphocytes. To verify this hypothesis, we determined the number of CD4+ T cells and CD20+ cells/mm<sup>2</sup> in cHL lymph nodes. While we did not have detailed information regarding the differential lymphocyte counts in the peripheral blood of our patients, we found that children with lymphopenia at diagnosis had lower numbers of CD4+ lymphocytes/mm<sup>2</sup> in the tumour microenvironment (median with lymphopenia 70 vs. 187 without lymphopenia,  $p = 0.001$ ; Mann–Whitney *U*-test) suggesting that at least the number of CD4+ T cells in the tumour microenvironment may reflect in part the situation in the peripheral blood.

Overall, we found between 1 and 624 (median 155) CD4+ T cells/mm<sup>2</sup> and between 1 and 885 (median 196) CD20+ B cells/mm<sup>2</sup>. The number of CD4+ lymphocytes/mm<sup>2</sup> increased with age but this was not statistically significant ( $p = 0.9$ , Spearman's correlation), while the number of CD20+ lymphocytes/mm<sup>2</sup> showed statistically significant decline ( $p = 0.015$ , Spearman's correlation), resulting in a significant shift of the CD4/CD20 ratio (Figure 2). In our series, MC cases displayed lower numbers of CD4+ lymphocytes/mm<sup>2</sup> (median MC 108 vs. 188.5 in other subtypes,  $p = 0.048$ ; Mann–Whitney *U*-test), higher numbers of CD20+ lymphocytes/mm<sup>2</sup> (median MC 281 vs. 182.5 in other subtypes,  $p = 0.046$ ; Mann–Whitney *U*-test) and a CD4/CD20 ratio  $< 1$  in most cases ( $p = 0.005$ , Fisher's exact test), indicating that a small number of CD4+ T cells in comparison to CD20+ lymphocytes in the tumor microenvironment is associated with MC subtype (Table 1; Figure 2). Although we did not have any information regarding the numbers of CD4+ and CD20+ cells in the peripheral blood of our patients, our data are well in line with previous studies [43,44] and with the concept that the number of lymphocytes that are recruited to the tumor microenvironment may be



**Figure 2.** (A) Correlation between age and the number of CD4+ lymphocytes/mm<sup>2</sup>. An increase of the number of CD4+ cells with age is seen, although this correlation is not statistically significant ( $p = 0.9$ , Spearman's correlation). (B) Distribution of the number of CD4+ lymphocytes/mm<sup>2</sup> by age group. (C) Correlation between age and the number of CD20+ lymphocytes/mm<sup>2</sup>. There is a statistically significant inverse correlation between these variables ( $p = 0.015$ , Spearman's correlation). (D) Distribution of the number of CD20+ lymphocytes/mm<sup>2</sup> by age group

influenced by the number of these cells in the peripheral blood [45].

No differences were observed regarding these variables and EBV status of HRS cells. In multivariate analysis, MC was associated with the presence of EBV ( $p = 0.045$ , 95% CI: 0.00–0.38) and a CD4/CD20 ratio  $< 1$  ( $p = 0.014$ , 95% CI:  $-0.43$  to  $-0.05$ ).

Our hypothesis is that MC development in children is not a direct consequence of early EBV infection because most Brazilian children from all regions are primarily exposed to EBV at a young age [40,41,46]. Instead, MC histopathogenesis might take place in the context of particular immune responses against EBV reflected by a low CD4+ T cell/CD20+ B-cell ratio. Conversely, it is possible that NS originates predominantly in the context of a better immune response against EBV and/or tumour antigens expressed in the neoplastic cells.

In conclusion, intermediate epidemiological patterns of cHL may exist in developing countries. The MC subtype in children may be a consequence of primary EBV infection in the context of an impaired immune system.

## Acknowledgements

Dr. Luitpold Distel kindly provided the image analysis software. This study was financially supported by Swissbridge Foundation (Switzerland), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ/PensaRio) and INCT para Controle do Câncer (Grants CNPq 573806/2008-0 and FAPERJ E26/170.026/2008) (Brazil). M.H.M.B. is supported by a PhD fellowship from CAPES-DAAD (Brazil–Germany). The authors indicate no potential conflicts of interest.

## References

1. Kuppers R, Rajewsky K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 471–493.
2. Swerdlow SH. *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4th edn), International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2008.
3. Barros MH, Scheliga A, De Matteo E, et al. Cell cycle characteristics and Epstein–Barr virus are differentially associated with

- aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients. *Leuk Lymphoma* 2010; **51**(8): 1513–1522.
4. Armstrong AA, Alexander FE, Cartwright R, *et al.* Epstein–Barr virus and Hodgkin’s disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia* 1998; **12**(8): 1272–1276.
  5. Harris NL. The many faces of Hodgkin’s disease around the world: what have we learned from its pathology? *Ann Oncol* 1998; **9** (Suppl 5): S45–S56.
  6. Hassan R, Klumb CE, Felisbino FE, *et al.* Clinical and demographic characteristics of Epstein–Barr virus-associated childhood Burkitt’s lymphoma in Southeastern Brazil: epidemiological insights from an intermediate risk region. *Haematologica* 2008; **93**(5): 780–783.
  7. Chabay PA, Barros MH, Hassan R, *et al.* Pediatric Hodgkin lymphoma in 2 South American series: a distinctive epidemiologic pattern and lack of association of Epstein–Barr virus with clinical outcome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; **30**(4): 285–291.
  8. Rappaport H, Berard CW, Butler JJ, Dorfman RF, Lukes RJ, Thomas LB. Report of the Committee on Histopathological Criteria Contributing to Staging of Hodgkin’s Disease. *Cancer Res* 1971; **31**(11): 1864–1865.
  9. Schreck S, Friebel D, Buettner M, *et al.* Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 2009; **27**(1): 31–39.
  10. Claviez A, Tiemann M, Luders H, *et al.* Impact of latent Epstein–Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin’s lymphoma. *J Clin Oncol* 2005; **23**(18): 4048–4056.
  11. Huang X, van den Berg A, Gao Z, *et al.* Expression of HLA class I and HLA class II by tumor cells in Chinese classical Hodgkin lymphoma patients. *PLoS ONE* 2010; **5**(5): e10865.
  12. Chang KL, Albuja PF, Chen YY, Johnson RM, Weiss LM. High prevalence of Epstein–Barr virus in the Reed–Sternberg cells of Hodgkin’s disease occurring in Peru. *Blood* 1993; **81**(2): 496–501.
  13. Armstrong AA, Alexander FE, Paes RP, *et al.* Association of Epstein–Barr virus with pediatric Hodgkin’s disease. *Am J Pathol* 1993; **142**(6): 1683–1688.
  14. Razzouk BI, Gan YJ, Mendonca C, *et al.* Epstein–Barr virus in pediatric Hodgkin disease: age and histiotype are more predictive than geographic region. *Med Pediatr Oncol* 1997; **28**(4): 248–254.
  15. Zarate-Osorno A, Roman LN, Kingma DW, Meneses-Garcia A, Jaffe ES. Hodgkin’s disease in Mexico. Prevalence of Epstein–Barr virus sequences and correlations with histologic subtype. *Cancer* 1995; **75**(6): 1360–1366.
  16. Preciado MV, De Matteo E, Diez B, Menarguez J, Grinstein S. Presence of Epstein–Barr virus and strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin’s disease. *Blood* 1995; **86**(10): 3922–3929.
  17. Monterroso V, Zhou Y, Koo S, Glackin C, Bujan W, Medeiros LJ. Hodgkin’s disease in Costa Rica: a report of 40 cases analyzed for Epstein–Barr virus. *Am J Clin Pathol* 1998; **109**(5): 618–624.
  18. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, *et al.* The role of Epstein–Barr virus in Hodgkin’s disease from different geographical areas. *Arch Dis Child* 1996; **74**(1): 27–31.
  19. Zhou XG, Sandvej K, Li PJ, *et al.* Epstein–Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV-related lymphoma. *Cancer* 2001; **92**(6): 1621–1631.
  20. Chan JK, Yip TT, Tsang WY, Lau WH, Wong CS, Ma VW. Detection of Epstein–Barr virus in Hodgkin’s disease occurring in an Oriental population. *Hum Pathol* 1995; **26**(3): 314–318.
  21. Liu SM, Chow KC, Chiu CF, Tzeng CH. Expression of Epstein–Barr virus in patients with Hodgkin’s disease in Taiwan. *Cancer* 1998; **83**(2): 367–371.
  22. Huh J, Park C, Juhng S, Kim CE, Poppema S, Kim C. A pathologic study of Hodgkin’s disease in Korea and its association with Epstein–Barr virus infection. *Cancer* 1996; **77**(5): 949–955.
  23. Peh SC, Looi LM, Pallesen G. Epstein–Barr virus (EBV) and Hodgkin’s disease in a multi-ethnic population in Malaysia. *Histopathology* 1997; **30**(3): 227–233.
  24. Leoncini L, Spina D, Nyong’o A, *et al.* Neoplastic cells of Hodgkin’s disease show differences in EBV expression between Kenya and Italy. *Int J Cancer* 1996; **65**(6): 781–784.
  25. Kusuda M, Toriyama K, Kamidigo NO, Itakura H. A comparison of epidemiologic, histologic, and virologic studies on Hodgkin’s disease in western Kenya and Nagasaki, Japan. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **59**(5): 801–807.
  26. Dinand V, Dawar R, Arya LS, Unni R, Mohanty B, Singh R. Hodgkin’s lymphoma in Indian children: prevalence and significance of Epstein–Barr virus detection in Hodgkin’s and Reed–Sternberg cells. *Eur J Cancer* 2007; **43**(1): 161–168.
  27. De Matteo E, Baron AV, Chabay P, Porta J, Dragosky M, Preciado MV. Comparison of Epstein–Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients. *Arch Pathol Lab Med* 2003; **127**(10): 1325–1329.
  28. Ambinder RF, Browning PJ, Lorenzana I, *et al.* Epstein–Barr virus and childhood Hodgkin’s disease in Honduras and the United States. *Blood* 1993; **81**(2): 462–467.
  29. Andriko JA, Aguilera NS, Nandedkar MA, Abbondanzo SL. Childhood Hodgkin’s disease in the United States: an analysis of histologic subtypes and association with Epstein–Barr virus. *Mod Pathol* 1997; **10**(4): 366–371.
  30. Weinreb M, Day PJ, Murray PG, *et al.* Epstein–Barr virus (EBV) and Hodgkin’s disease in children: incidence of EBV latent membrane protein in malignant cells. *J Pathol* 1992; **168**(4): 365–369.
  31. Khan G, Norton AJ, Slavin G. Epstein–Barr virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype. *Cancer* 1993; **71**(10): 3124–3129.
  32. Coates PJ, d’Ardenne AJ, Slavin G, Kingston JE, Malpas JS. Detection of Epstein–Barr virus in Reed–Sternberg cells of Hodgkin’s disease arising in children. *Med Pediatr Oncol* 1993; **21**(1): 19–23.
  33. Brousset P, Rochaix P, Chittal S, Rubie H, Robert A, Delsol G. High incidence of Epstein–Barr virus detection in Hodgkin’s disease and absence of detection in anaplastic large-cell lymphoma in children. *Histopathology* 1993; **23**(2): 189–191.
  34. Claviez A, Tiemann M, Peters J, Kreipe H, Schneppenheim R, Parwaresch R. The impact of EBV, proliferation rate, and Bcl-2 expression in Hodgkin’s disease in childhood. *Ann Hematol* 1994; **68**(2): 61–66.
  35. Kanavaros P, Sakalidou A, Tzardi M, *et al.* Frequent detection of Epstein–Barr virus (EBV), EBV transcripts and latent membrane protein-1 (LMP-1) in tumor cells in Hodgkin’s disease arising in childhood. *Pathol Res Pract* 1994; **190**(11): 1026–1030.
  36. Jarrett RF, Stark GL, White J, *et al.* Impact of tumor Epstein–Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. *Blood* 2005; **106**(7): 2444–2451.
  37. Bigni R. *Linfoma de Hodgkin*. Instituto Nacional do Câncer: Rio de Janeiro; 2010. [cited 2010 23/12/2010]; Available from: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=458](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=458).
  38. Vassallo J, Paes RP, Soares FA, *et al.* Histological classification of 1,025 cases of Hodgkin’s lymphoma from the State of Sao Paulo. *Brazil. Sao Paulo Med J* 2005; **123**(3): 134–136.
  39. Araujo I, Bittencourt AL, Barbosa HS, *et al.* The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. *Virchows Arch* 2006; **449**(3): 315–319.
  40. Carvalho RP, Evans AS, Pannuti CS, Frost P, Grossman L, Jamra MA. EBV infections in Brazil. III—Infections mononucleosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1981; **23**(4): 167–172.
  41. Figueira-Silva CM, Pereira FE. Prevalence of Epstein–Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitoria, State of Espirito Santo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; **37**(5): 409–412.
  42. Biggar RJ, Jaffe ES, Goedert JJ, Chaturvedi A, Pfeiffer R, Engels EA. Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. *Blood* 2006; **108**(12): 3786–3791.

43. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, *et al.* Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992; **120**(2 Pt 1): 216–222.
44. Heldrup J, Kalm O, Prellner K. Blood T and B lymphocyte subpopulations in healthy infants and children. *Acta Paediatr* 1992; **81**(2): 125–132.
45. Poppema S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005; **1**: 231–238.
46. Black FL, Hierholzer WJ, Pinheiro F, *et al.* Evidence for persistence of infectious agents in isolated human populations. *Am J Epidemiol* 1974; **100**(3): 230–250.

## **ANEXO IX – PRÊMIOS**

## Mário Henrique

---

De: Sobope - Sociedade Brasileira de Oncologia Pediatrica [sobope@uol.com.br]  
Enviado em: sexta-feira, 30 de outubro de 2009 19:08  
Para: mariohmb@uol.com.br  
Assunto: PARABENIZAÇÃO AOS BOLSISTAS/SOCIO - SOBOPE SIOP 2009



PREZADO(a) Sócio(a),

A SOBOPE parabeniza e agradece a participação de todos no Congresso da SIOP 2009. Dentre os 1175 inscritos, haviam 322 brasileiros, 103 sócios da SOBOPE e 84 bolsistas.

Para tanto a SOBOPE parabeniza as **BOLSISTAS** :

**Gisele Moledo Vasconcelos**

**Marcela Braga mansur**

**Ethel F. Gorender (SÓCIA SOBOPE)**

E ao **SÓCIO**:

**Mario Henrique Magalhães Barros**

Por seus pôsteres premiados.

Segue abaixo  
Parabéns !!!!

*Leukaemia I*

**PA.016**

**INVESTIGATING THE ROLE OF VIRAL INFECTIONS IN THE ETIOLOGY OF COMMON ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA THROUGH EPIGENOMIC APPROACH**

**Gisele M Vasconcelos**, Maria S Pombo-de-Oliveira, Brock C Christensen, Sheng Zhong, Ru-Fang Yeh, Synara Nô Seara Cordeiro, Patricia Buffler, Maria S Pombo-de-Oliveira, Joseph L Wiemels  
*Brazil, United States*

*Leukaemia III*

**PA.057**

**NOTCH1 EARLY DETECTION IN INFANT T-CELL LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

**Marcela Braga Mansur**, Maria S Pombo-de-Oliveira, Mariana Emerenciano, Alessandra Splendore, Lilian Brewer, Rocio Hassan, Maria S Pombo-de-Oliveira  
*Brazil*

**PL.018**

**NASOPHARYNGEAL CARCINOMA IN ADOLESCENCE: C-ERBB2 AS A PROGNOSTIC FACTOR**

**Ethel F Gorender**, Priscilla Lucia Meirelles Batiston Junqueira, Renato Melaragno, Alejandro Arancibia, Sidnei Epelman  
*Brazil*

*Lymphoma*

**PC.002**

**THE IL10 PROMOTER POLYMORPHISMS COULD INFLUENCE THE HISTOLOGICAL VARIABILITY OF PEDIATRIC HODGKIN LYMPHOMA**

**Mário Barros**, Carolina Minnicelli, Valeria Hakim, Yuri Tirelli, Tarssyo Capdeville, Fernando Soares, Ilana Zalcberg, Rocio Hassan  
*Brazil*

\_\_\_\_\_ Informação do NOD32 IMON 4561 (20091031) \_\_\_\_\_

Esta mensagem foi verificada pelo NOD32 sistema antivírus  
<http://www.eset.com.br>

## Mário Henrique

---

**De:** Rosalinde Kennis [secretariat@siop.nl]  
**Enviado em:** quinta-feira, 4 de novembro de 2010 14:05  
**Para:** aikarat@mail.ru; sumitw.gupta@utoronto.ca; mariohmb@bol.com.br; Kovar Heinrich; maearieta@hotmail.com; sethenral@gmail.com; fredrik.hedborg@genpat.uu.se; catarina.trager@ki.se; makiyama@jikei.ac.jp; ujumaily@khcc.jp; elena\_1357@mail.ru; ulrike.leiss@meduniwien.ac.at; sandra.jacobs@med.kuleuven.be; greg.armstrong@stjude.org; sarah.wallingford@manchester.ac.uk; 'Paola Angelini'  
**Assunto:** SIOP 2010 Boston, US

Dear Poster Presenter at SIOP 2010,

Please be informed that your poster has won the Best poster Prize of your discipline in Boston.

You are awarded a certificate

- Please could you send us your address to where you want us to send the certificate.

We look forward to hearing from you and again, congratulations with the Best Poster Prize!

With kind regards,

Rosalinde Kennis  
SIOP

\_\_\_\_\_ Informação do NOD32 IMON 5591 (20101104) \_\_\_\_\_

Esta mensagem foi verificada pelo NOD32 sistema antivírus  
<http://www.eset.com.br>

## **BEST POSTERS SIOP 2010**

ALL - POSTERS A

### **PA045**

**OPTIMIZATION OF E.COLI ASPARAGINASE TREATMENT FOR STANDARD RISK CHILDHOOD ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: MOSCOW-BERLIN 2002 STUDY EXPERIENCE**

**Alexander Karachunskiy, Joachim Boos, Julia Roumiantseva, Claudia Lanvers-Kaminsky, Natalia Ponomareva, Olga Aleinikova, Larisa Fechina, Olga Khlebnikova, Konstantin Kondratchik, Dmitry Litvinov, Olga Riskal, Elmira Boychenko, Natalia Chapligina, Olga Tselousova, Anastasiya Shamardina, Olga Kozlova, Marina Goroshkova, Svetlana Lagoiko, Galina Pavlova, Alexander Shapochnik, Oleg Budanov, Svetlana Varfolomeeva, Arend von Stackelberg, Alexander Rumyantsev, Günter Henze**

*Russian federation, Germany, Belarus*

ACUTE LEUKAEMIES – POSTERS B

### **PB004**

**INCIDENCE AND PREDICTORS OF TREATMENT RELATED MORTALITY IN CHILDREN WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN CENTRAL AMERICA**

**Sumit Gupta, Miguel Bonilla, Patricia Valverde, Ligia Fu, Scott Howard, Raul Ribeiro, Lillian Sung**

*Canada, El salvador, Guatemala, Honduras, United states*

LYMPHOMAS – POSTERS C

### **PC010**

**CTLA4 POLYMORPHISMS INFLUENCE HISTOLOGICAL AND CLINICAL CHARACTERISTICS AND OUTCOME IN PEDIATRIC HODGKIN LYMPHOMA**

**Mário Henrique Barros, Tarssyo Medeiros, Vanessa Scholl, Yuri Tirelli, Ilana Zalcborg, Rocio Hassan**

*Brazil*

BONE TUMOURS – POSTERS D

### **PD003**

**AN INTEGRATED GENOMICS APPROACH UNRAVELS A ROLE FOR MICRO-RNAS IN EWS-FLI1 DRIVEN EWING'S SARCOMA PATHOGENESIS**

**Heinrich Kovar, Pieter Mestdagh, Max Kauer, Jozef Ban, Sven Bilke, Raphaela Schwentner, Frank Speleman, Paul Meltzer, Jo Vandesompele**

*Austria, Belgium, United states*

HISTIOCYTOSIS AND STEM CELL TRANSPLANTATION – POSTERS E

### **PE004**

**SECONDARY HEMOPHAGOCYTIC SYNDROME**

**Arrieta María Elizabeth, Galdeano Jose Emilio, Rodriguez Gustavo, Mengual Marcela, Arias Daniel**

*Argentina*

RENAL TUMOURS – POSTERS G

**PG001**

**LOSS OF HETEROZYGOSITY AT 11P13 AND 11P15 IN WILMS TUMOR IN INDIAN POPULATION**

**Elanthenral Sigamani, Mohammad Nahidul Wari, Venkateswaran K Iyer, Sandeep Agarwala, Arundhati Sharma, Amit K Dinda, Sameer Bakhshi**

*India*

NEUROBLASTOMA – POSTERS H  
SPLIT PRIZE!

**PH036**

**AGE-DEPENDENT GENOTYPES IN HIGH-RISK NEUROBLASTOMA: MYCN AMPLIFICATION IS A FAST TRACK TO AGGRESSIVE DISEASE WHEREAS SEGMENTAL DELETION OF 11Q IMPLIES A MORE COMPLEX, MULTI-STEP TUMOR EVOLUTION**

**Fredrik Hedborg, Cihan Cetinkaya, Tommy Martinsson, Per Kogner, Jan Dumanski, Catarina Träger, Teresita Diaz de Ståhl**

*Sweden*

**PH038**

**DIFFERENCES IN BIOLOGICAL FEATURES AND SURVIVAL IMPROVEMENT BETWEEN GENETIC SUBSETS OF HIGH-RISK NEUROBLASTOMA INDICATE THE NEED OF ADAPTED TREATMENT**

**Catarina TRäger, Åsa Vernby, Helena Caren, Hanna Kryh, Tommy Martinsson, Fredrik Hedborg, Göran Gustafsson, Per Kogner**

*Sweden*

GERM CELL TUMOURS, RETINOBLASTOMA AND RARE TUMOURS – POSTERS I

**PI002**

**HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS VALPROIC ACID AND DEPSIPEPTIDE SENSITIZE RETINOBLASTOMA CELLS TO RADIOTHERAPY BY INCREASING H2AX PHOSPHORYLATION AND P53 ACETYLATION-PHOSPHORYLATION**

**Masaharu Akiyama, Takeshi Kawano, Yoko Terao, Takaaki Yanagisawa, Hiroyuki Ida, Hisashi Yamada**

*Japan*

SOFT TISSUE SARCOMAS – POSTERS J

**PJ014**

**EVIDENCE-BASED DECISIONS AND BETTER CARE OF RHABDOMYOSARCOMA IN JORDAN**

**Usama Aljumaily, Taleb Ismael, Omar Ayyad, Main Masarweh, Khalil Ghandour, Abdelatif Almousa, Andrea Ferrari, Iyad Sultan**

*Jordan, Italy*

GERM CELL TUMOURS, RETINOBLASTOMA AND RARE TUMOURS – POSTERS L

**PL025**

**ULTRASOUND DIAGNOSTIC OF SCROTAL TUMOR LESIONS IN CHILDREN**

**Helen Mikhailova, Natalya Koshechkina**

*Russian federation*

**BRAIN TUMOURS - POSTERS M**

**PM029**

**IMPACT OF VISUAL PERCEPTION AND ORGANIZATIONAL SKILLS ON LEARNING AND MEMORY IN CHILDREN WITH BRAIN TUMORS**

**Ulrike Leiss, Thomas Pletschko, Agathe Schwarzinger, Irene Slavc**

*Austria*

**HISTIOCYTOSIS AND STEM CELL TRANSPLANTATION – POSTERS N**

**PN009**

**IMMUNE MODULATORY CAPACITIES OF HUMAN MULTIPOTENT ADULT PROGENITOR CELLS ON NATURAL KILLER-CELL PROLIFERATION, CYTOKINE PRODUCTION, AND CYTOTOXICITY**

**Sandra Jacobs, Jef Pinxteren, Wouter van't Hof, Robert Deans, Catherine M Verfaillie, Stefaan W Van Gool**

*Belgium, United states*

**EPIDEMIOLOGY – POSTERS P**

**SPLIT PRIZE**

**PP006**

**COMPARISON OF TRENDS IN THE INCIDENCE OF CUTANEOUS MALIGNANT MELANOMA IN <25 YEAR OLDS IN ENGLAND WITH OLDER ADULTS, 1979-2006**

**Sarah Wallingford, Robert D. Alston, Adele C. Green, Jillian M. Birch**

*United kingdom, Australia*

**PP008**

**INCIDENCE RATES AND SURVIVAL TRENDS OF CANCER IN 0-29 YEAR OLDS BY ETHNIC GROUP IN YORKSHIRE, UK**

**Marlous van Laar, Patricia A. McKinney, Roger C. Parslow, Adam Glaser, Sally E. Kinsey, Ian J. Lewis, Susan V. Picton, Michael Richards, Geoff Shenton, Daniel P. Stark, Paul D. Norman, Richard G. Feltbower**

*United kingdom*

**LATE EFFECTS – POSTERS Q**

**PQ017**

**MYOCARDIAL STRAIN FOR DETECTION OF TREATMENT-RELATED CARDIAC TOXICITY IN ADULT SURVIVORS OF PEDIATRIC CANCER**

**Gregory Armstrong, Kirsten Ness, Vikki Nolan, Daniel Green, Vijaya Joshi, Melissa Hudson, Leslie Robison, Deekumar Srivastava, Jean-Bernard Durand, Juan Carlos Plana**

*United states*

SUPPORTIVE AND PALLIATIVE CARE – POSTERS R

Split Prize

**PR009**

**PRESUMPTIVE TREATMENT FOR MALARIA IS NOT JUSTIFIED IN CHILDREN RECEIVING CANCER CHEMOTHERAPY: PROSPECTIVE STUDY OF 100 EPISODES OF FEBRILE NEUTROPENIA FROM INDIA**

**Deepak Bansal, Piyush Gautam, M L Dubey, R K Marwaha**

*India*

**PR030**

**PAIN MANAGEMENT AND OPIOIDS USE IN PAEDIATRIC ONCOLOGY IN INDIA: A QUALITATIVE APPROACH**

**Paola Angelini, Eric Bouffet, Vicky Breakey, Kathrine Boydell, Purna Kurkure, Marian Muckaden, Brijesh Arora**

*Canada, India*

OTHERS, CARE AND TRAINING – POSTERS T

**PT020**

**A NOVEL MODEL OF TWINNING: OUTREACH PROGRAMS IN THE BORDER REGION**

**Paula Aristizabal, Sara Day, George Velez, Gaston Rivera, Carlos Rodriguez-Galindo, Raul Ribeiro, William Roberts**

*United states*

NURSING – POSTERS U

**PU019**

**PSYCHOSOCIAL HEALTH IN CHILDREN AND ADOLESCENTS SURVIVING CANCER**

**Mary-Elizabeth Bradley Eilertsen, Toril Rannestad, Marit S. Indredavik, Torstein Vik, Trude Reinfjell, Heidi Killingberg**

*Norway*