

MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

LINFOMA DE HODGKIN NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA.
UM ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS, CLÍNICAS,
EPIDEMIOLÓGICAS E DE ASSOCIAÇÃO COM O VÍRUS EPSTEIN-BARR

MÁRIO HENRIQUE MAGALHÃES BARROS

2007

Mário Henrique Magalhães Barros

Linfoma de Hodgkin na Infância e Adolescência. Um Estudo das Características Histológicas, Clínicas, Epidemiológicas e de Associação com o Vírus Epstein-Barr.

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Oncologia.

Orientadores: Ilana Zalcborg Renault
 Rocio Hassan

Rio de Janeiro, 2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mário Henrique Magalhães Barros

Linfoma de Hodgkin na Infância e Adolescência. Um Estudo das Características Histológicas, Clínicas, Epidemiológicas e de Associação com o Vírus Epstein-Barr.

Aprovada em:

Prof. (Presidente)

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

Rio de Janeiro, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

B2771 Barros, Mário Henrique Magalhães

Linfoma de Hodgkins na infância e adolescência: um estudo das características histológicas, clínicas, epidemio - lógicas e de associação com o vírus Epstein-Barr. / Mário Henrique Magalhães Barros. - Rio de Janeiro: INCA, 2007. 181 f il. color. Tab.

Inclui anexos e bibliografia.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia- Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2007.

Orientadores: Ilana Zalcborg Renault e Rocio Hassan.

1. Doença de Hodgkin. 2. Linfoma. 3. Vírus Epstein-Barr. I. Renault, Ilana Zalcborg. II. Hassan, Rocio. III. Título.

CDD 616.99446

Aos pequenos heróis, especialmente os do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, que mesmo diante de tão grave enfermidade não perdem o brilho e a alegria da infância.

À Dra. Vera Morais que me apresentou ao lindo e apaixonante caminho da oncologia pediátrica.

“Qualquer amor já é um pouquinho de saúde, um descanso na loucura.”

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

À Rocio Hassan pela amizade, pelos cuidados, por ter me ensinado a caminhar e pela disponibilidade em estar sempre por perto para amparar nos momentos difíceis.

À Ilana Zalcborg por ter acreditado e incentivado os meus sonhos.

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

Ao Gustavo e a Deisy pela amizade, carinho e companhia nesta caminhada.

A Marina, Vanessa, Maria, Virgínia, Telma, Priscila, Lyanna, Esteban, Fernanda, Ana Paula e Rodrigo, amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO, pelo companheirismo ao longo destes anos.

A Elena de Mateo (Argentina) pela segunda revisão histológica dos casos e pelas divertidas horas passadas em conjunto no microscópio.

Ao Dr. Paulo Faria, chefe do departamento de Patologia do INCa, por ter me dado condições de concretizar este sonho.

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 e ao Luigi por toda a amizade, ajuda, companheirismo e paciência nestes últimos dois anos.

A minha família que me apóia a cada passo dado.

Ao Marcos Santos pela ajuda inicial nas curvas de sobrevida.

A Leda Saba, Maria do Carmo e Yoon Chang, amigas do laboratório Locus (SP), pelo uso do maravilhoso foto-microscópio que possibilitou a documentação dos casos com excelente qualidade, além do apoio e carinho ao longo do último ano.

A Vera Moraes, Tereza Cartaxo, Inalda Fortunato, Edinalva Leite, Adriana Moraes, Fátima Lima, Terezinha Salles, Mariluze Silva e Sandra Araújo, amigos do Centro de Oncohematologia Pediátrica do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (Recife-PE) pelo apoio ao longo desta jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O linfoma de Hodgkin (LH) é uma doença heterogênea tanto nos níveis clínico-biológico, epidemiológico quanto etiopatogênico. O vírus Epstein-Barr (EBV) está relacionado a uma percentagem variável de casos de LH pediátrico, dependendo do nível sócio-econômico da população analisada. O objetivo deste estudo foi caracterizar clínico-biológicamente um grupo de pacientes com LH infantil, diagnosticados no INCA Rio de Janeiro, assim como determinar a freqüência e características da associação com o EBV. Foram incluídas 65 crianças com LH diagnosticadas no INCA entre 1999 e 2003. Todos os casos tiveram revisão histopatológica. O diagnóstico do EBV no material tumoral foi realizado por hibridização *in situ* para os RNAs-EBER, imunohistoquímica para LMP1 e PCR para os genes EBNA2 e LMP1. Foram estudadas 65 crianças (idades 3 a 18 anos; mediana 14 anos) e proporção M:F de 1,4:1. A esclerose nodular (EN) foi o subtipo mais comum (82,8%), seguida da celularidade mista (CM) (12,5%). O EBV esteve associado com 47,7% dos casos com positividade variando de <5% (9,7%) à >75% (67,7%) de células neoplásicas. O EBV foi mais prevalente nos casos de CM (7/8, 87,5%) ($p= 0,057$), entretanto, 23/53 (43,3%) casos com EN também foram EBV+. A correlação do EBV com grupos etários (\leq ou > 10 anos), mostrou que 62,5% das crianças ≤ 10 anos eram EBV+, bem como 42,8% das crianças > 10 anos. A EN foi mais prevalente em ambos os grupos etários. Estadiamentos precoces apresentaram tendência de associação com o grupo de menor idade ($p= 0,07$). O grau II (GII) da EN se associou a maior número de células neoplásicas (CN) ($p= 0,0005$) e a maior número de mitoses ($p= 0,04$). Na análise univariada, um maior número de CN esteve relacionado a grupo de doença desfavorável ($p= 0,01$), presença de massa mediastinal ($p= 0,01$) e de sintomas B ($p= 0,04$). Os casos BAX-positivos apresentaram tendência de associação com o p53 ($p= 0,059$) e associação com sintomas B ($p= 0,04$). A massa mediastinal associou-se à leucocitose ($p= 0,001$) que por sua vez apresentou correlação com infiltrado eosinofílico ($p= 0,056$), sintomas ($p= 0,01$) e tempo de evolução da doença maior que 120 dias ($p= 0,002$). A sobrevida livre de doença (SLD) foi de 94,7% e a sobrevida global de 87,5%. Na análise univariada, os casos de doença desfavorável com mais de 40 células neoplásicas em 10 campos de grande aumento ($p= 0,004$), EN GII ($p= 0,002$) e Ki-67 $\geq 51\%$ ($p= 0,05$) tiveram melhor SLD. Na equação de Cox, estas variáveis prognósticas perderam significância estatística. Este grupo de pacientes com LH infantil foi caracterizado por: 1) predomínio de pacientes mais velhos; 2) maior prevalência da EN; 3) uma possível diferença clínico-biológica na doença que acomete crianças menores e maiores de 10 anos e 4) severidade da doença possivelmente relacionada com o número de células neoplásicas, necessitando entretanto, de uma ampliação da amostra para a validação destes resultados. Financiamento: Swiss Bridge Foundation e CAPES.

Palavras-Chaves: Linfoma de Hodgkin pediátrico, vírus Epstein-Barr, classificação histológica.

ABSTRACT

Hodgkin lymphoma (HL) is a heterogeneous disease, regarding histological, clinico-biological and epidemiologic characteristics. Epstein-Barr virus (EBV) is associated to a variable percentage of pediatric HL cases, depending on socio-economic status of at risk populations. The aim of this study was to characterize clinical and biological features of a group of children diagnosed with HL at the INCA, Rio de Janeiro, as well as to determine the EBV association frequency and characteristics of EBV-associated HL. This study included 65 children diagnosed at INCA between 1999 and 2003. Histopathological revision was performed in all cases. EBV diagnosis was performed in tumor masses by RNAs-EBER *in situ* hybridization, LMP1 immunolocalization and PCR for EBNA2 and LMP1 genes. We studied 65 children (ages 3 to 18 years; median 14 years) and sex ratio (M:F) 1,4:1. Nodular sclerosis (NS) was the more frequent histological subtype (82,8%), followed by mixed cellularity (MC) (12,5%). EBV was detected in 47,7% of cases, with positivities varying from <5% (9,7%) to >75% (67,7%) of neoplastic cells. The EBV was more frequent in the MC cases (7/8, 87,5%) ($p= 0,057$), however, 23/53 (43,3%) of NS cases were also EBV+. The EBV association regarding age groups (\leq or $>$ 10 years), showed that 62,5% and 42,8% of ≤ 10 years/ >10 children were EBV+, respectively. NS was equally frequent in both age groups. Early clinical stages (I/II) showed a trend to be associated with younger ages ($p= 0,07$). NS degree II (DII) was associated to a higher number of neoplastic cells (NC) ($p= 0,0005$) and a higher number of mitosis ($p= 0,04$). In univariate analysis, a higher number of NC was associated to the unfavourable disease group ($p= 0,01$), mediastinal mass ($p= 0,01$) and B symptoms ($p= 0,04$). BAX-positive tumors showed a trend to be associated to p53 expression ($p= 0,059$) and B symptoms ($p= 0,04$). Mediastinal mass was associated to leucocytosis ($p= 0,001$), which showed association with eosinophilic infiltrate ($p= 0,056$), symptoms ($p= 0,01$) and disease evolution before diagnosis ($p= 0,002$). The Disease free survival (DFS) was 94,7% and global survival was 87,5%. In univariate analyses, unfavourable disease with more than 40 NC ($p= 0,004$), DII NS ($p= 0,002$) and Ki-67 $\geq 51\%$ ($p= 0,05$) showed better DFS. This group of patients with pediatric HL was characterized by: 1) predominance of old children (adolescents); 2) high frequency of NS histological subtype; 3) possible clinical and biological differences between age groups (younger and older than 10 years) and 4) severity of the disease that might be related to the number of MC. Financial support: Swiss Bridge Foundation and CAPES.

Key-words: Hodgkin lymphoma, Childhood, Epstein-Barr virus, histologic classification.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 2.1	Modelo de patogênese do linfoma de Hodgkin associado ao vírus Epstein-Barr	33
Figura 5.1	Distribuição do número de casos por ano de diagnóstico no INCA	60
Figura 5.2	Distribuição etária dos casos incluídos no estudo. Número de casos por idade	61
Figura 5.3	Freqüência das idades nos grupos de pacientes do sexo masculino e feminino	61
Figura 5.4	Distribuição dos casos por procedência	62
Figura 5.5	Distribuição dos casos quanto à intensidade do infiltrado eosinofílico	68
Figura 5.6	Características histológicas de alguns casos de linfoma de Hodgkin incluídos neste estudo	69
Figuras 5.7	Mais exemplos de características histológicas encontradas nos casos de linfoma de Hodgkin incluídos neste estudo	70
Figura 5.8	Exemplos de casos imunopositivos para o CD30	73
Figura 5.9	Exemplos de casos positivos para o CD15 e CD20	74
Figura 5.10	Exemplos de casos com imunoexpressão do p53, Bax e Ki-67	77
Figura 5.11	Associação entre o subtipo histológico e o número de células neoplásicas em 10 CGA	80
Figura 5.12	Associação entre o subtipo histológico e o número de mitoses em 10 CGA	80
Figura 5.13	Relação entre a imunoexpressão do CD20 e o número de eosinófilos (Eo) em 10 CGA	85
Figura 5.14	Exemplos de casos positivos para os EBERs	91
Figura 5.15	Exemplos de casos positivos para LMP1 e EBERs	92
Figura 5.16	Exemplos de casos imunopositivos para LMP1	93
Figura 5.17	Amplificação da deleção de 30 pb na região C-ter do gene LMP1	95
Figura 5.18	Status de seguimento dos 60 casos analisáveis	105

Figura 5.19	Sobrevida global e sobrevida livre de doença dos 57 casos com seguimento completo	106
Figura 5.20	Sobrevida global e sobrevida livre de doença estratificando-se os pacientes por grupo de risco	107
Figura 5.21	Sobrevida livre de doença de todos os casos, estratificando-os pelo número de sítios topográficos acometidos	108
Figura 5.22	Sobrevida livre de doença no grupo e pacientes com doença desfavorável, estratificando-os pelo número de sítios topográficos acometidos	109
Figura 5.23	Sobrevida livre de doença dos casos de esclerose nodular estratificando-se os pacientes quanto ao grau da esclerose nodular	110
Figura 5.24	Sobrevida livre de doença dos casos de esclerose nodular por grupos de risco, estratificando-os quanto ao grau da esclerose nodular	110
Figura 5.25	Sobrevida livre de doença dos casos de esclerose nodular estratificando-se os pacientes quanto ao grau da esclerose nodular	111
Figura 5.26	Sobrevida livre de doença do grupo de risco desfavorável, estratificando-se os pacientes quanto ao índice de proliferação celular (Ki-67 positivo em pelo menos 51% de células H-RS)	112
Figura 5.27	Sobrevida livre de doença nos grupos de risco favorável e desfavorável em relação à presença do vírus Epstein-Barr	113
Figura 6.1	Célula neoplásica positiva para BAX em mitose	129

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 2.1	Padrões de latência do vírus Epstein-Barr nas diferentes neoplasias	31
Tabela 4.1	Valor de referência dos exames laboratoriais analisados	44
Tabela 4.2	Descrição dos anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico	50
Tabela 5.1	Distribuição do número de casos quanto à procedência, por grupo etário (< 10 anos / > 10 anos)	62
Tabela 5.2	Dados clínico-laboratoriais do grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin estudados	65
Tabela 5.3	Descrição dos subtipos histológicos, subtipos da esclerose nodular, grau da esclerose nodular e padrão interfolicular nos 64 linfonodos analisados	67
Tabela 5.4	Descrição do número de células H-RS, mitose e eosinófilos encontrados em 10 CGA	68
Tabela 5.5	Freqüência dos casos distribuídos quanto ao percentual de células neoplásicas CD30+, de acordo às técnicas de revelação empregadas	71
Tabela 5.6	Freqüência dos casos de linfoma de Hodgkin distribuídos nos grupos definidos pelo percentual de células neoplásicas CD15+ e CD20+	72
Tabela 5.7	Imunofenótipo dos casos de linfoma de Hodgkin estudados	72
Tabela 5.8	Expressão de p53 de acordo com o percentual das células neoplásicas positivas	75
Tabela 5.9	Expressão de Bax de acordo com o percentual das células neoplásicas positivas	76
Tabela 5.10	Expressão do Ki-67 de acordo com o percentual das células neoplásicas positivas	76
Tabela 5.11	Padrões de expressão de p53, Bax e Ki-67 nos linfomas de Hodgkin estudados	78

Tabela 5.12	Análise comparativa da eficiência do TMA para cada anticorpo com e sem a inclusão de amostras duplicadas	79
Tabela 5.13	Associação entre o número de células H-RS, variáveis histológicas e clínicas	82
Tabela 5.14	Regressão logística entre o número de células neoplásicas e o grau da EN, o alto índice de proliferação celular, o grupo de risco e a massa mediastinal	83
Tabela 5.15	Associação entre o número de mitoses em 10 CGA e o grau da esclerose nodular	84
Tabela 5.16	Associação entre a imunexpressão do CD20 e a intensidade do infiltrado eosinofílico	86
Tabela 5.17	Características histopatológicas e clínicas dos casos CD20 positivos	87
Tabela 5.18	Regressão logística entre a imunexpressão do CD20 e o número de eosinófilos, a intensidade do infiltrado eosinofílico e a leucometria	87
Tabela 5.19	Características histopatológicas e clínicas dos casos Bax positivos	88
Tabela 5.20	Distribuição percentual das células neoplásicas expressando os transcritos EBERs e a proteína LMP1	90
Tabela 5.21	Associação entre o vírus Epstein-Barr e os subtipos histológicos	96
Tabela 5.22	Características clínicas e histológicas por grupos de idade	97
Tabela 5.23	Associação entre a presença da massa mediastinal e as variáveis clínico-laboratoriais	99
Tabela 5.24	Regressão logística da massa mediastinal com sintomas, grupo de risco, leucometria e nível de hemoglobina	100
Tabela 5.25	Associação entre a contagem leucocitária e as variáveis clínico-laboratoriais	101
Tabela 5.26	Regressão logística da leucometria com a intensidade do infiltrado eosinofílico, tipo de sintomas e intervalo diagnóstico	101
Tabela 5.27	Esquema quimioterápico recebido pelos 60 pacientes analisados	103

Tabela 5.28	Distribuição dos casos submetidos à radioterapia quanto ao campo utilizado	103
Tabela 5.29	Estratégia terapêutica (quimioterapia e/ou radioterapia) dos 60 pacientes analisados	104
Tabela 5.30	Status de seguimento dos 60 casos divididos nos 3 grupos de análise	105
Tabela 5.31	Distribuição por estadiamento e grupos de risco dos casos que recaíram	107
Tabela 5.32	Frequência de casos quanto ao número de sítios acometidos (≤ 5 versus > 5) e o estadiamento	108
Tabela 5.33	Regressão de Cox das variáveis relacionadas a sobrevida livre de doença na análise univariada	113
Tabela 6.1	Prevalência do EBV no linfoma de Hodgkin pediátrico: principais séries de casos publicadas na literatura	148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

µM: Micromol

ABVD: Adriplastina, Bleomicina, Vincristina e DTIC

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

Ca: Cálcio

Células HRS: Células de Hodgkin e Reed-Sternberg

CGA: Campo de Grande Aumento

CM: Celularidade Mista

COPP: Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina e Prednisona

DHL: Desidrogenase láctica

DIPAT: Departamento Integrado de Anatomia Patológica.

DL: Depleção Linfocitária

E.M.: Elena de Matteo

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

Eo: Eosinófilo

EUA: Estados Unidos da América

FIP: Fixado e Incluído em Parafina

FFS: Sobrevida livre de eventos

HE: Hematoxilina e Eosina.

INCa: Instituto Nacional de Câncer

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

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

ISH: Hibridização *in situ*

LH: Linfoma de Hodgkin

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: Linfotoxina

mM: Milimolar

NK: Natural Killer

OEPA: Vincristina, Etoposide, Prednisona e Adriblastina

OMS: Organização Mundial de Saúde.

OPPA: Vincristina, Procarbazina, Prednisona e Adriblastina

PC: Proliferação Celular

PCR: Reação da Cadeia de Polimerase.

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

SG: Sobrevida Global

SLD: Sobrevida Livre de Doença

SUS: Sistema Único de Saúde

TFD: Tratamento Fora do Domicílio

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

TMA: *Tissue Micro-Array*

TNFR: Receptor do fator de necrose tumoral

VHS: Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

	Pag.	
1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Características Clínicas	22
2.2	Características Epidemiológicas	24
2.3	Características Histológicas	25
2.4	O Vírus Epstein-Barr	30
2.5	Fatores Prognósticos no Linfoma de Hodgkin	36
3	OBJETIVOS	40
3.1	Objetivo Geral	40
3.2	Objetivos Específicos	40
4	METODOLOGIA	42
4.1	Desenho do Estudo	42
4.2	População do Estudo	42
4.3	Critérios de Inclusão	42
4.4	Critérios de Exclusão	42
4.5	Dados Clínico-Epidemiológicos	43
4.6	Estudo Histológico	44
4.7	Construção do Tissue Micro-Array (TMA)	46
4.8	Preparação do Material Tumoral em Lâminas para Imunohistoquímica e Hibridização In Situ	47
4.9	Estudo Imunohistoquímico	48
4.10	Hibridização <i>in situ</i> para EBER-1 (EBER-ISH)	52
4.11	Extração de DNA	54
4.12	Detecção e Tipificação do EBV por PCR	55
4.13	Detecção da Deleção de 30 pb na Região Carboxilo-terminal do Gene LMP1	56
4.14	Definições de Resposta e Sobrevida	56
4.15	Análise Estatística	58

4.16	Critérios Éticos	59
5	RESULTADOS	60
5.1	Características Clínicas, Epidemiológicas e Laboratoriais do Grupo Estudado	59
5.2	Perfil Histológico dos Linfomas de Hodgkin Estudados	66
5.3	Perfil Imunofenotípico dos Linfomas de Hodgkin Estudados	71
5.4	Imunoexpressão do p53, Bax e Ki-67	75
5.5	Avaliação da Eficiência dos Métodos Convencionais e TMA no Estudo Imunohistoquímico no Linfoma de Hodgkin	78
5.6	Características Histológicas e Clínicas dos Linfomas de Hodgkin Estudados	79
5.6.1	Características Histológicas dos Subtipos do Linfoma de Hodgkin	79
5.6.2	Número de Células Neoplásicas	81
5.6.3	Número de Mitoses	83
5.6.4	Padrão Interfolicular	84
5.7	Características Histológicas e Clínicas Associadas à Imunoexpressão dos Anticorpos Estudados	84
5.7.1	Imunoexpressão do CD20	85
5.7.2	Imunoexpressão do CD30 e CD15	88
5.7.3	Imunoexpressão do BAX, p53 e Ki-67	88
5.8	Características Histológicas, Clínicas e Moleculares Encontradas nos Casos de Linfoma de Hodgkin Associados ao Vírus Epstein-Barr	89
5.9	Caracterização Histológicas e Clínica dos Grupos Etários ≤ 10 anos e > 10 anos no Linfoma de Hodgkin	96
5.10	Correlações Entre as Características Clínicas e Laboratoriais	98
5.11	Tratamento, Seguimento e Fatores Prognósticos	102
6	DISCUSSÃO	114
6.1	Características Clínicas e Demográficas	114
6.2	Características Histológicas e Imunofenotípicas	116
6.3	O Papel do TMA no Linfoma de Hodgkin	131

6.4	Fatores Histológicos e Imunohistoquímicos Influenciadores das Características Clínicas	132
6.5	Características Clínico-Laboratoriais	134
6.6	Associação do Vírus Epstein-Barr com o Linfoma de Hodgkin Pediátrico	136
6.7	O linfoma de Hodgkin nas crianças pequenas (<10 anos) é uma doença diferente?	150
6.8	Prognóstico e Sobrevida	151
7	CONCLUSÕES	158
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
9	ANEXOS	182

1- INTRODUÇÃO

O linfoma de Hodgkin é uma doença heterogênea tanto do ponto de vista histopatológico quanto epidemiológico. No passado, a origem celular desta doença foi uma incógnita, hoje, graças às técnicas de microdissecção e de biologia molecular, sabe-se que as células neoplásicas, células de Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS), são de origem linfóide, clonais, e na grande maioria das vezes derivadas de células B (Küppers et al, 1998).

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 agentes etiológicos ambientais possam estar envolvidos (Correa e O'Connor, 1971; Gutensohn e Cole, 1980; Re et al, 2005).

O vírus Epstein-Barr (EBV) tem sido um importante candidato à agente etiológico. Inicialmente, baseado nas evidências indiretas oriundas de estudos epidemiológicos e sorológicos (Rosdahl et al, 1981; Evans and Gutensohn, 1984; Mueller et al, 1989) e hoje devido à demonstração clonal do material genético do vírus nas células neoplásicas (Re et al, 2005).

O EBV parece estar associado ao linfoma de Hodgkin em certos grupos epidemiológicos particulares e pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Zhou et al, 2001). Vários estudos mostraram a alta frequência de associação entre o EBV e o linfoma de Hodgkin pediátrico em distintos grupos geográficos e sócio-econômicos (Armstrong et al, 1993; Leoncini et al, 1996; Zhou et

al, 2001; Jarrett et al, 2002). Entretanto, são escassos os estudos no Brasil que mostrem de modo real a prevalência do EBV no linfoma de Hodgkin nesta faixa etária. Não existem dados na literatura sobre esta associação tanto na cidade, quanto no Estado do Rio de Janeiro. O conhecimento da prevalência do EBV e das características clínico-biológicas desta associação na nossa população é importante, não apenas por razões de saúde pública, mas também por fornecer subsídios necessários ao entendimento do papel deste vírus na biologia do linfoma de Hodgkin e para o desenvolvimento futuro de estudos clínicos e de imunoterapias celulares.

De 60 a 90% das crianças com linfoma de Hodgkin são curadas de suas doenças com as técnicas terapêuticas atuais, porém um grupo considerável de pacientes ainda morre por progressão de doença (Voute et al, 1998); por outro lado, cerca de 80% das crianças curadas de linfoma de Hodgkin no Brasil apresentam efeitos tardios secundários ao tratamento anitneoplásico (Barros et al, 2003).

Determinar se no linfoma de Hodgkin pediátrico, que acomete as crianças desta região do Brasil, a associação com o EBV e a imunoexpressão de marcadores celulares têm impacto prognóstico é significativo por permitir o refinamento dos grupos de risco, possibilitando a separação dos pacientes que necessitariam de tratamento mais intensivo daqueles que se beneficiariam de terapêutica menos agressiva, com conseqüente diminuição dos efeitos tardios.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características Clínicas

Os linfomas são a terceira neoplasia mais prevalente da infância, representando o linfoma de Hodgkin 10 a 30% de todo este total (Voute et al, 1998).

Linfadenopatia cervical é a forma de apresentação clínica mais comum. Cerca de 80% das crianças possuem envolvimento linfonodal em região de cabeça e pescoço e 60% exibem envolvimento mediastinal (Donaldson e Kaplan, 1982). A maioria dos pacientes possui doença supradiaphragmática. 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 a 30% dos doentes ao diagnóstico (Carbone et al, 1971). A prevalência desses sintomas aumenta com o estadiamento.

O estadiamento Ann Arbor (Carbone et al, 1971) para o linfoma de Hodgkin, gradua esta doença em 4 níveis de acordo com número e a localização de cadeias linfonodais envolvidas:

I) Comprometimento de uma única região ganglionar (I) ou comprometimento de um único órgão ou sítio extralinfático (I_E);

II) 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_E);

III) Comprometimento de regiões ganglionares em ambos os lados do diafragma (III), podendo incluir o baço (III_S) e/ou comprometimento limitado de órgão ou sítio extralinfático contíguo (III_E, III_{ES});

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

Na tentativa de se estabelecer uma terapia risco-específica, o linfoma de Hodgkin pode ainda ser dividido em grupos de risco, combinando-se o estadiamento clínico com a presença dos sintomas “B”. Os pacientes com estadiamento IIB, IIIB e IV são considerados como grupo de evolução desfavorável e os demais como grupo de evolução favorável (Vassilakopoulos et al, 2005).

O tratamento das crianças e adolescentes com linfoma de Hodgkin pode envolver radioterapia, quimioterapia ou a combinação de ambos. A utilização de radioterapia exclusiva é aplicada em 10 a 15% dos pacientes, sendo bastante controversa no grupo pediátrico (Specht et al, 1992). A maioria dos protocolos de tratamento a utiliza nos estádios avançados como consolidação da quimioterapia e nos estádios precoces apenas quando há doença residual após o tratamento com as drogas antineoplásicas (Voute et al, 1998).

A poliquimioterapia para o tratamento do linfoma de Hodgkin era baseada inicialmente na utilização da mostarda nitrogenada (Olweny et al, 1971), uma droga que hoje é sabidamente indutora de segunda neoplasia, sobretudo quando associada à radioterapia (Bhatia et al, 1996). A utilização do MOPP (mostarda nitrogenada, vincristina, procarbazina e prednisona) é responsável por cerca de 78% de sobrevida livre de doença (SLD) e 94% de sobrevida global (Weiner et al, 1997).

Os regimes quimioterápicos atuais não empregam mais a mostarda nitrogenada e estão baseados na utilização dos antracíclicos e agentes alquilantes em baixas doses (Voute et al, 1998). Estes protocolos de tratamento, até o momento, têm alcançado respostas semelhantes ou superiores, diferindo

basicamente nas complicações secundárias agudas e tardias (Donaldson e Link, 1987; Freyer et al, 1990; Oberlin et al, 1992; Hudson et al, 1993; Hunger et al, 1994; Shankar et al, 1997; Weiner et al, 1997; Schellong et al, 1999).

2.2 Características Epidemiológicas

Um definido pico bimodal de incidência, ausente na maioria dos outros linfomas, é bem estabelecido no linfoma de Hodgkin. Países em desenvolvimento apresentam o primeiro pico na infância, já nos países desenvolvidos, em adultos jovens; o segundo pico ocorre nos adultos em ambos os grupos (Mueller, 1997; Hsu e Glaser, 2000). Ainda nos países em desenvolvimento, é observada maior prevalência de casos no sexo masculino (Correa e O'Connor, 1971).

De acordo com o descrito por Harris, há 3 padrões epidemiológicos do linfoma de Hodgkin conforme o nível sócio-econômico. No padrão I, visto em países pouco desenvolvidos e grupos de baixo poder sócio-econômico, a incidência do linfoma de Hodgkin mostra um pico de incidência precoce, acometendo crianças abaixo dos 10 anos; não há um pico na terceira década de vida, sendo observado um aumento gradativo de casos com o avançar da idade. O tipo histológico predominante é a celularidade mista (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 esclerose nodular (EN). O padrão II é intermediário, com dois picos de incidência bem definidos (infância e segunda década de vida) e freqüência semelhante dos subtipos CM e EN; esse padrão é característico dos países em desenvolvimento (Harris, 1998).

O Brasil, um país de dimensões continentais, parece enquadrar-se no padrão II da classificação de Harris. Numa análise preliminar do último protocolo do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento do Linfoma de Hodgkin na Infância e Adolescência (GCBTLH), dos 588 pacientes inscritos, 224 (39,3%) eram do subtipo CM e 207 (40,6%) do subtipo EN, o que representa uma distribuição semelhante entre estes subtipos histológicos (Bruniera et al, 2006).

2.3 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 linfoma de Hodgkin, e a forma “Clássica” a qual é subclassificada em esclerose nodular, celularidade mista, rico em linfócitos (RL) e depleção linfocitária (DL). Um fator comum a ambos os grupos é que as células neoplásicas representam até 10% do total de células do tecido tumoral (Jaffe et al, 2001).

O LHPLN acomete mais freqüentemente o sexo masculino e o grupo etário de 30 a 50 anos, sendo extremamente raro na faixa etária pediátrica. Histologicamente, é caracterizado pela substituição parcial ou total do linfonodo por um infiltrado de pequenos linfócitos, histiócitos epitelióides e células Reed-Sternberg variante linfocítica e/ou histiocítica (células L&H). As células L&H são grandes, possuem citoplasma escasso e núcleo dobrado (células “pipoca”), membrana nuclear fina, nucléolo múltiplo, basofílico e grande, além de cromatina vesiculosa. Arquiteturalmente, o arranjo pode ser nodular ou nodular e difuso. As células L&H são positivas para CD20, CD79a, BCL6 e CD45 (imunofenótipo de centro

germinativo). O antígeno de membrana epitelial (EMA) é expresso em 50% dos casos. A perda de expressão do CD15 e CD30 acontece em quase todos os casos, porém, imunomarcção para o CD30 pode ocasionalmente ser encontrada. Muitas das células L&H são circundadas por linfócitos T CD3 positivos (Jaffe et al, 2001).

As células H-RS representam a população celular neoplásica do linfoma de Hodgkin clássico. Estudos imunológicos e moleculares têm mostrado que estas células originam-se de células B maduras do centro germinativo, apresentando os genes de imunoglobulina com hipermutação somática, indicando que elas passaram pelo centro germinativo e estão “bloqueadas” na fase de centrocito ou pós-centrocito do processo de maturação de células B (Kamel et al, 1995; Kanzler et al, 1996; Crawford, 2001). Embora genotipicamente o linfoma de Hodgkin seja considerado um linfoma de células B, a imunoexpressão do CD20, marcador de diferenciação B, só ocorre em 20 a 30% dos casos (Watanabe et al, 2000). A imunoexpressão do CD30 ocorre em praticamente todos os casos. O CD15 exibe positividade variando entre 75 e 80%; sua expressão pode ocorrer apenas numa minoria das células neoplásicas (Jaffe et al, 2001).

Morfologicamente, as células de Reed-Sternberg (RS) são grandes com citoplasma abundante e levemente basofílico. O núcleo é grande, quase sempre arredondado e contornado por membrana nuclear proeminente, a cromatina é pálida e apresentam no mínimo dois nucléolos eosinofílicos, os quais encontram-se 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 (H). 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 e neutrófilos (Jaffe et al, 2001).

O subtipo EN compreende cerca de 70% dos casos de linfoma de Hodgkin clássico nos países desenvolvidos (Correa e O’Conor, 1971). 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 (Jaffe et al, 2001). 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 (Lukes e Butler, 1966; Lukes, 1971; Buttler e Pugh, 1993).

O grupo britânico de estudo do linfoma de Hodgkin (Benett et al, 1981, 1983; MacLenan et al, 1992) propôs um sistema de graduação para este subtipo o qual estaria relacionado ao desfecho clínico dos pacientes. No grau I, 75% ou mais dos nódulos contém escassas células H-RS num fundo inflamatório não neoplásico. Já o grau II exhibe 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, ou seja, um ninho de células preenchendo um campo de grande aumento (MacLenan et al, 1992; Jaffe et al, 2001). Com o tratamento poliquimioterápico, esta graduação perdeu impacto prognóstico (van Spronsen et al, 1997).

O grupo alemão de estudo do linfoma de Hodgkin (von Wasielewski et al, 2003) propôs uma nova graduação para os casos de EN a qual estaria relacionada à sobrevida global nos estadios 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 esclerose nodular de baixo risco e aqueles com pelo menos um, de esclerose nodular de alto risco (von Wasielewski et al, 2003).

O linfoma de Hodgkin CM é o subtipo histológico mais comum nos países em desenvolvimento e em pacientes HIV positivos (Correa e O'Connor, 1971; Zhou et al, 2001). Caracteriza-se por apresentar escassas células H-RS num difuso ou vagamente nodular infiltrado inflamatório misto sem fibrose esclerosante nodular (Jaffe et al, 2001).

O subtipo rico em linfócitos exibe escassas células H-RS, fundo nodular (mais comum) ou difuso de pequenos linfócitos sem neutrófilos e eosinófilos. Uma proporção de células H-RS pode se assemelhar às células L&H ou às células lacunares mononucleares (Jaffe et al, 2001).

O linfoma de Hodgkin depleção linfocitária é uma forma difusa do linfoma de Hodgkin clássico, rico em células H-RS e/ou com diminuição do número de linfócitos não neoplásicos. Assim como na CM, apresenta maior prevalência nos países em desenvolvimento e indivíduos HIV positivos. Outro padrão encontrado é o de fibrose difusa com ou sem proliferação de fibroblastos e somente poucas células RS (Jaffe et al, 2001).

A presença de um 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 (Strum e Rappaport, 1970; Lukes, 1971; Doggett et al, 1983). Este tipo de padrão não tem significado

prognóstico (Colby et al, 1982) e alguns estudos sugerem que seria mais prevalente nas crianças em relação aos adultos (Andriko et al, 1997; Zhou et al, 2001).

A necrose é um achado infreqüente e quase sempre associada à grande número de células H-RS as quais formam ninhos coesos (Lukes et al, 1966). Alguns casos podem mostrar abscesso eosinofílico com área de necrose central (Colby et al, 1982).

Em relação ao tamanho da população de células neoplásicas (Jaffe et al, 2001), não há na literatura estudos que a correlacionem com variáveis histo-clínico-epidemiológicas. As células H-RS não costumam exibir grande atividade mitótica, apenas 10% dos casos possuem mais de 10 mitoses em 10 campos de grande aumento (CGA) (Nguyen et al, 1989).

A composição do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin é bastante heterogênea e consiste de linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos, células estromais e fibroblastos. A freqüência de cada uma destas células varia com o subtipo histológico do linfoma de Hodgkin clássico. Na maioria dos casos, os linfócitos T CD4 representam a maioria da população celular, e apresentam capacidade regulatória. Linfócitos T CD4 do subtipo Th1 e CD8 citotóxicos são escassos nos tecidos comprometidos pelo linfoma de Hodgkin e geralmente não detectados nas proximidades das células H-RS (Poppema, 2005).

A quantidade de eosinófilos presentes no microambiente tumoral é variável e depende da liberação de citocinas eosinofílicas: IL-5 (Samoszuk e Nansen, 1990), IL-9 (Glimelius et al, 2006) e CCL28 (Hanamoto et al, 2004) pelas células H-RS e eotaxina (CCL11) pelos fibroblastos (Jundt et al, 1999; Re et al, 2005). O infiltrado eosinofílico parece exibir relevância prognóstica nos casos de esclerose nodular (von Wasielewski et al, 2003; Glimelius et al, 2006).

2.4 O Vírus Epstein-Barr (EBV)

O EBV é um vírus linfotrópico membro da família Herpesvírus que infecta assintomaticamente mais de 90% da população humana (Crawford, 2001). O EBV ingressa no organismo via epitélios 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 (Rickinson e Kieff, 2001).

O EBV encontra-se também associado a algumas neoplasias: linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, doença linfoproliferativa pós-transplante e linfoma de Hodgkin (Gandhi, 2004) e por isso foi considerado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como carcinógeno humano do grupo I (International Agency for Research on Cancer, 1997).

Dois tipos de EBV circulam na maioria da população humana, os tipos 1 e 2, os quais diferem nos genes de latência EBNA2 e EBNA3 A-C. O EBV1 é mais freqüente nos países desenvolvidos, enquanto o EBV2 é mais freqüente na África (Hsu e Glaser, 2000).

O potencial oncogênico do EBV é refletido pela sua capacidade de infectar e transformar linfócitos B numa linhagem celular linfoblastóide de crescimento contínuo. Estudos *in vitro* mostraram que o EBV1 apresenta maior capacidade de transformação do que o EBV2 (Pope et al, 1968; Rickinson e Kieff, 2001).

A hipótese da associação entre o EBV e o linfoma de Hodgkin foi baseada nas evidências de que a história de mononucleose infecciosa aumentava em 3 vezes o risco de desenvolvimento da doença (Gutensohn and Cole, 1980) e nas alterações nos níveis séricos de anticorpos anti-EBV encontradas antes do desenvolvimento deste linfoma (Mueller et al, 1989). Com a detecção do genoma clonal do EBV nas células H-RS, pôde-se estabelecer a relação entre o EBV e o linfoma de Hodgkin numa proporção de casos (Meyer et al, 2004).

O EBV possui distintos programas de expressão gênica, chamados “padrões de latência” que são encontrados nas diferentes etapas da biologia viral (Thorley-Lawson, 2001). As neoplasias associadas ao EBV apresentam uma latência viral específica, relacionada com a origem celular e com o papel etiopatogênico do vírus na patologia (Thorley-Lawson, 2001; Crawford, 2001) (tabela 2.1).

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, LMP2B	Linfoma de Hodgkin Carcinoma de Nasofaringe
III	EBERs, EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C, EBNA4, LMP1, LMP2A, LMP2B	Doença Linfoproliferativa Pós-transplante

EBERs: pequeno RNA viral do Epstein-Barr; EBNA: *Epstein-Barr virus nuclear antigen*; LMP: *Latent membrane protein*. Adaptado de Crawford, 2001.

A proteína EBNA1 media o início da síntese do DNA viral, e é responsável da segregação e manutenção do DNA viral nas células proliferantes (Leight e Sugden, 2000).

A proteína LMP1 é considerada o principal oncogene viral. É um membro pela superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) e se assemelha ao CD40 (Meyer et al, 2004) o qual é um receptor de membrana essencial para a ativação das células B (Lam e Sugden, 2002). Em contraste ao CD40, LMP1 encontra-se constitutivamente ativa, independente da presença de um ligante e é o maior efetor das alterações celulares induzidas pelo EBV (Gandhi, 2004) (figura 2.1).

Tanto o CD40, quando associado ao seu ligante, quanto a LMP1 ativam a transcrição do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Poppema, 2005). Nas células H-RS, o NF- κ B regula a expressão de genes de citocinas, quimiocinas, apoptose, moléculas de sinalização intracelular e fatores de transcrição (Hinz et al, 2002).

Além da LMP1, a proteína LMP2A encontra-se também envolvida na patogênese do linfoma de Hodgkin 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 BCR e mantém o sinal tônico necessário a sobrevivência celular, fornecendo sinais de resgate da apoptose, nas células B antes de completada a maturação no centro germinativo (Meyer et al, 2004). 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 linfoma de Hodgkin (Hammerschmidt e Sugden, 2004) (figura 2.1).

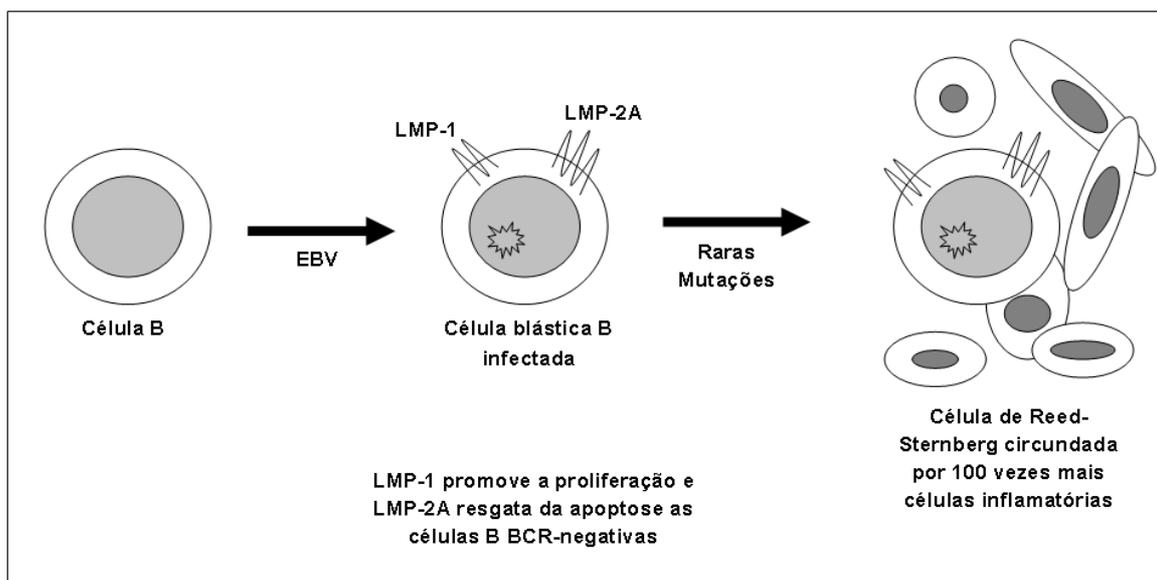


Figura 2.1: Modelo de patogênese do linfoma de Hodgkin associado ao vírus Epstein-Barr. O EBV infecta a célula B imatura antes que ela entre no centro germinativo. LMP2A consegue resgatar da apoptose aquelas células que falharam no processo de maturação e expressão das imunoglobulinas. LMP1 promove a 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 (Hammerschmidt e Sugden, 2004).

O diagnóstico dos linfomas de Hodgkin associados ao EBV 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 latentes infectadas num número elevado de cópias, representando o “padrão ouro” para a localização e detecção de EBV latente em células H-RS (Meyer et al 2004). A imunolocalização da proteína LMP1 por imunohistoquímica nas células H-RS 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 consequência 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 (Gulley, 2001).

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 6 anos de idade (Henle et al, 1969; De Matteo et al, 2003; Figueira-Silva e Pereira, 2004).

Em países desenvolvidos, o número de linfoma de Hodgkin EBV positivos em adultos varia de 30 a 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 linfoma de Hodgkin, talvez associado a fatores ambientais e étnicos (Herbst et al, 1991; Ambinder et al, 1998).

Uma relação patogênica entre o EBV e o linfoma de Hodgkin na infância é sugerida por várias linhas de evidência; diversos fatores, como a etnia e a localização geográfica, podem representar modificadores biológicos desta associação (Ambinder et al, 1998). 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%) (Engel et al, 2000).

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, porém a literatura é contraditória. Alguns estudos mostram um predomínio de

positividade nos casos de CM (Glaser et al, 1997; Ambinder et al, 1998; De Matteo, 2003) 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 a 100% dos casos) (Ambinder et al, 1998; Engel et al, 2000). A maioria dos estudos mostra maior prevalência de casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos no sexo masculino (Herbst et al, 1991; Glaser et al, 1997; Ambinder et al, 1998; Engel et al, 2000; De Matteo, 2003).

Em relação à idade, as crianças com até 10 anos exibem maior associação do EBV com o linfoma de Hodgkin do que as crianças mais velhas (Claviez et al, 2005).

No Brasil, os estudos referentes à prevalência do EBV no linfoma de Hodgkin pediátrico que retratem de forma fidedigna a realidade regional são escassos. O mais recente estudo mostra que 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 (Araújo et al, 2006). Esta prevalência é semelhante a do EBV no linfoma de Burkitt, também na mesma região (87%) e no mesmo grupo etário (Araújo et al, 1996).

No Rio de Janeiro, a freqüência de associação entre o EBV e o linfoma de Hodgkin na população pediátrica não foi, até o presente trabalho, estudada. Talvez seja inferior à encontrada na Bahia, uma vez que associação do mesmo vírus com o linfoma de Burkitt pediátrico é menor (aproximadamente 60%) (Klumb et al, 2004; Hassan et al, 2006).

2.5 Fatores Prognósticos no Linfoma de Hodgkin

Antes da introdução das modernas técnicas de radioterapia e poliquimioterapia, o estadiamento clínico e o subtipo histológico exibiam forte correlação prognóstica. Atualmente, possuem impacto na predição prognóstica a idade, presença de sintomas B, número de cadeias linfonodais acometidas, concentração de hemoglobina, velocidade de sedimentação eritrocitária (VSH) e níveis séricos de: albumina, lactato-desidrogenase (DHL), β -microglobulina e IL10 (Jaffe et al, 2001; Tzankov et al, 2003a).

Atualmente, fatores relacionados à biologia do linfoma de Hodgkin estão sendo investigados na tentativa de se aumentar a predição do desfecho clínico, permitir a utilização de terapias adaptadas a risco e criar as bases para o racional de estudos clínicos.

Com a introdução da imunohistoquímica na prática histológica, vários estudos têm sido realizados na tentativa de estabelecer o valor prognóstico da positividade ou negatividade dos marcadores imunológicos nas células H-RS. A literatura é controversa quanto ao papel do CD20 como fator prognóstico. O CD20 é uma proteína semelhante a um canal de cálcio, cuja expressão ocorre após o rearranjo da cadeia leve de imunoglobulina e antes da expressão do BCR; relaciona-se com a transdução de sinal para a diferenciação de células B e proliferação, bem como com a transição de G0 (intérfase) para G1 (início do ciclo celular) (Rassidakis et al, 2002a; Tzankov et al, 2003a).

O grupo do Sloan-Kettering Cancer Center encontrou um prognóstico desfavorável nos casos de linfoma de Hodgkin CD20 positivos (Donnelly et al, 1999). O Grupo Alemão de Estudo do Linfoma de Hodgkin encontrou resultado prognóstico semelhante nos casos CD20 positivos, quando associados à negatividade do CD30

e CD15 (van Wasielewski et al, 1997). Contudo, outros estudos têm falhado no estabelecimento do CD20 como fator prognóstico independente (van Wasielewski et al, 1997; Donnelly et al, 1999; Tzankov et al, 2003a).

O papel do CD15 no prognóstico do linfoma de Hodgkin tem sido objeto de avaliação por alguns estudos. O grupo alemão tem mostrado que a perda do CD15 está relacionada à recaída e a pior sobrevida livre de doença (Petrella et al, 1989; van Wasielewski et al, 1997). Porém, a quase totalidade dos estudos em pediatria não conseguiu reproduzir os achados do referido grupo (Rassidakis et al, 2002).

O CD30, por sua vez, não parece estar relacionado ao desfecho clínico das crianças com linfoma de Hodgkin (Petrella et al, 1989; van Wasielewski et al, 1997; Rassidakis et al, 2002).

Conforme referido anteriormente, a maioria das células H-RS são derivadas de linfócitos B do centro germinativo com mutações deletérias dos genes de imunoglobulina (Kuppers e Rajewsky, 1998). A falta de funcionalidade do BCR, decorrente destas mutações, levam os linfócitos B normais à apoptose; as alterações nos mecanismos de morte celular estão relacionadas ao evento linfomagênico (Rassidakis et al, 2002b). O gene *BAX* codifica uma proteína de mesmo nome, pertencente à família de Bcl-2, que atua na regulação da morte celular. A apoptose é promovida quando a proteína BAX está em excesso, formando homodímeros BAX-BAX. Quando BAX se dimeriza com algumas das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x_l) sua ação é inibida (Brousset et al, 1996). A imunoexpressão do BAX pelas células H-RS ocorrem em até 98,4% dos casos, a depender do ponto de corte utilizado na consideração de positividade (Brousset et al, 1996; Rassidakis et al, 2002b; Montalbán et al, 2004). Esta proteína não parece

estar relacionada ao desfecho clínico dos pacientes com linfoma de Hodgkin (Rassidakis et al, 2002b; Montalbán et al, 2004).

Mutações no gene supressor de tumor *p53* são extremamente raras no linfoma de Hodgkin (Maggio et al, 2001; Küppers et al, 2002). Porém, a imunexpressão nuclear da proteína *p53* é um evento comum nesta neoplasia (Montalbán et al, 2004), provavelmente decorrente do acúmulo desta proteína em resposta ao dano do DNA, o que determina a parada do ciclo celular e/ou apoptose (Bellamy, 1996). O prognóstico desta expressão é controverso, principalmente por conta das disparidades na consideração dos pontos de corte (Brink et al, 1998; Montalbán et al, 2004; Kim et al, 2006).

A imunexpressão do antígeno Ki-67 (MIB1) ocorre toda vez que uma célula sai da quiescência, ou seja, encontra-se em G1, S, G2 ou M, e é usualmente interpretada como marcador de proliferação celular. Caracteristicamente, apresenta padrão de marcação nuclear (Gerdes et al, 1990). O percentual de casos de linfoma de Hodgkin que expressam o Ki-67 é bastante variado (entre 40% e 60%), sendo seu papel prognóstico controverso (Morente et al, 1997; Garcia et al, 2003; Montalbán et al, 2004; Sánchez-Aguilera et al, 2006).

Em relação ao impacto prognóstico do EBV, este não está bem estabelecido na literatura (Felbaum et al, 1992; Vestlev et al, 1992; Engel et al, 2000). Engel e colaboradores mostraram que crianças com linfoma de Hodgkin EBV positivo tinham melhor sobrevida livre de doença (Engel et al, 2000). Por outro lado, dois estudos de base populacional mostraram que a presença do EBV conferia pior prognóstico (Clarke et al, 2001; Gandhi et al, 2004). Recentemente, o grupo alemão mostrou que a associação do linfoma de Hodgkin pediátrico com o EBV não conferiu melhor sobrevida livre de doença (SLD) (Claviez et al, 2005). No Brasil, um estudo

com adultos mostrou que a mera presença do EBV não esteve relacionada com prognóstico clínico, porém o percentual de células H-RS expresando a proteína LMP1 foi correlacionado com melhor sobrevida global (Vasallo et al, 2001). Não há dados no Brasil sobre o impacto deste vírus no prognóstico das crianças com linfoma de Hodgkin.

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar as características clínico-epidemiológicas, histológicas, assim como a frequência de associação com o vírus Epstein-Barr no linfoma de Hodgkin pediátrico do Rio de Janeiro, representado pelos pacientes matriculados no Instituto Nacional de Câncer.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar as características clínico-epidemiológicas: procedência, nível sócio-econômico, sexo, idade, duração dos sintomas, intervalo diagnóstico, quadro clínico, sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG), dos pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin clássico;
- Caracterizar histologicamente os linfomas ao diagnóstico de acordo a subtipos histológicos, número de células neoplásicas em 10 campos de grande aumento (CGA), número de mitoses em 10 CGA, número de eosinófilos em 10 CGA, subtipo da esclerose nodular, graduação da esclerose nodular e existência de padrão interfolicular;
- Determinar o perfil fenotípico das células tumorais;
- Determinar a frequência de associação dos linfomas de Hodgkin com o EBV e as características histológicas e clínico-epidemiológicas dos casos EBV-positivos;
- Determinar o impacto da expressão do EBV e dos marcadores celulares CD20 e CD15 no prognóstico;

- Determinar a prevalência de imunoexpressão do p53, BAX e Ki-67 nas células tumorais e sua relação com o EBV, subtipo histológico, características clínico-epidemiológicas e resposta ao tratamento.

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 31/12/2003, tratados nos serviços de Hematologia e Oncologia Clínica, cujo diagnóstico do Departamento Integrado de Patologia (DIPAT) tenha sido de linfoma de Hodgkin.

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) (Jaffe et al, 2001);
- c) Existência do bloco de parafina com material tumoral do diagnóstico no arquivo do Departamento Integrado de Anatomia Patológica do INCA.

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 (Jaffe et al, 2001) foram também excluídos do estudo, assim como os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana.

4.5 Dados Clínico-Epidemiológicos

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

O nível sócio-econômico foi determinado indiretamente pelo número total de salários-mínimos ganho pela família do paciente, uma vez que só esta informação referente ao status sócio-econômico estava registrada. Este dado foi obtido do prontuário médico a partir da informação registrada pelo Serviço Social do INCA, conforme a ficha de coleta de dados (Anexo II).

- Nível 1: até 2 salários mínimos;
- Nível 2: de 3 a 5 salários mínimos;
- Nível 3: de 6 a 10 salários mínimos;
- Nível 4: mais de 10 salários mínimos.

Para as análises estatísticas referentes ao grupo etário, os pacientes foram divididos em 2 grupos: um com crianças de até 10 anos ao diagnóstico e o outro com pacientes de 11 anos ou mais.

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 ⁹ /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 (Carbone et al, 1971). Os pacientes com estadiamento IIB, IIIB e IV foram considerados como de grupo desfavorável, os demais como de grupo favorável (Vassilakopoulos et al, 2005).

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 (Carson, 1996), 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 diagnósticos foram revistos para confirmação dos mesmos. Os subtipos histológicos (EN, CM, DL e RL) foram classificados segundo a Organização Mundial de Saúde (Jaffe et al, 2001). Um segundo patologista experiente em hematopatologia (Dra. Elena De Matteo, Serviço de Patologia do Hospital de Crianças “Ricardo Gutierrez”, Argentina) revisou todos os diagnósticos, assim como a identificação dos subtipos histológicos, segundo a OMS. Os casos discordantes foram revistos conjuntamente em microscópio duplo para obtenção de um diagnóstico de consenso. Nenhum dos patologistas (M.H.M.B. e E.D.M.) tiveram

acesso ao laudo histológico do diagnóstico no momento da classificação dos subtipos histológicos.

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 (Bennett et al, 1983). Desta forma, a EN foi considerada de grau I quando 75% ou mais dos nódulos continham escassas células de Hodgkin e/ou de Reed-Sternberg (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 (Jaffe et al, 2001).

e) A subclassificação dos casos de esclerose nodular foi procedida seguindo os critérios da OMS (Jaffe et al, 2001).

f) O grau de envolvimento interfolicular pelo linfoma de Hodgkin foi estimado semiquantitativamente, conforme o escore proposto por Zhou et al. (2001):

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.

Definiu-se linfoma de Hodgkin com padrão interfolicular, os casos com escore 2 ou 3.

g) A classificação da intensidade do infiltrado eosinofílico foi baseada na graduação proposta por Enblad et al (1993), que leva em consideração a quantidade de eosinófilos em 10 CGA:

- Leve: menos de 10 Eo por 10 CGA;
- Moderado: de 11 a 200 Eo por 10 CGA;
- Acentuado: mais de 200 Eo por 10 CGA.

h) Todos os casos tiveram a presença de necrose avaliada.

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

As lâminas de HE representativas da neoplasia, conforme descrito no item “a” da seção “5.5”, 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 4 μ m 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 clorado (TPC, Instrumedics). As lâminas foram identificadas e armazenadas a -20° C.

Como cada caso possui duas áreas tumorais distintas, foi considerado como resultado final, em caso de diferenças no número de células neoplásicas positivas, a área de maior percentual.

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 Preparação do Material Tumoral em Lâminas para Imunohistoquímica e Hibridização *In Situ*

Numa primeira etapa, cada bloco de parafina selecionado para o estudo, conforme item “a” da seção “5.5”, foi recortado numa espessura de 4 μ m de modo a produzir 10 lâminas. Os cortes foram depositados em lâminas de vidro revestidas com adesivo especial (Superfrost Plus, Erviegas). Para manter a antigenicidade dos tecidos, as lâminas foram posteriormente mergulhadas em parafina derretida (parafinização das lâminas) e estocadas à -20°C. Nestas lâminas, foram procedidos os estudos imunohistoquímicos com CD20, CD15, CD30 e LMP1; além da hibridização *in situ* para o EBER-1.

Em um segundo momento, foi construído um tissue micro-array (TMA) para a realização do estudo imunohistoquímico com p53, BAX, Ki-67 e CD30.

O CD30 foi repetido no TMA com modificação da técnica imunohistoquímica inicial, utilizando-se para a visualização da reação o Kit Envision (Kit EnVision+, HRP DakoCytomation V.G.) ao invés do Kit LSAB+ (Kit LSAB+, HRP DakoCytomation V.G.) a fim de aumentar a sensibilidade da reação.

4.9 Estudo Imunohistoquímico

O estudo imunohistoquímico foi realizado conforme 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 incubação das lâminas no tampão citrato (pH 6,0) em forno de microondas a potência máxima, durante 18 minutos para 10 lâminas. 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 16 horas, a 4°C. 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 (100 µl) (Kit LSAB+, HRP DakoCytomation V.G.) foi aplicado sobre cada corte por 20 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com três banhos de 5 minutos em PBS;

h) Incubação da streptavidina (visualização): 100 µl de streptavidina peroxidase (Kit LSAB+, HRP DakoCytomation V.G.) foram aplicados sobre cada corte por 20 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com três banhos de 5 minutos em PBS;

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.

A imunomarcaco de CD30 nas lâminas de TMA (vide item 5.7) utilizou técnica semelhante à descrita anteriormente. Os passos referentes a desparafinizao, hidratao, recuperao antigênica e incubaco do anticorpo primário foram os mesmos. Os passos referentes à etapa de visualizao da reao foram combinados num único passo. Nesta etapa, 100 µl do reagente Envision (Kit EnVision+, HRP DakoCytomation V.G.) foram aplicados nos cortes de TMA por 20 minutos. Aps este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS, três banhos de 5 minutos cada um. Os passos seguintes foram idênticos.

A etapa do estudo referente à realizao do CD30 com o Kit EnVision+ (DakoCytomation V.G.) foi realizada em colaborao com o Dr. Fernando Augusto Soares, Departamento de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo.

A tabela 4.2 mostra as informaoes referentes ao fabricante, clone, diluio e controle dos anticorpos utilizados no estudo.

Tabela 4.2: Descrio dos anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico.

ANTICORPO	CLONE	FABRICANTE	DILUIO	CONTROLE
CD20	L-26	Dako	1:1000	Linfonodo reacional
CD15	C3D-1	Dako	1:50	Linfoma de Hodgkin EBV +
CD30	Ki-1	Dako	1:40	Linfoma de Hodgkin EBV +
LMP-1	CS 1-4	Dako	1:50	Linfoma de Hodgkin EBV +
p53	DO-7	Dako	1:500	Melanoma
BAX	BAX	Dako	1:150	Linfonodo reacional
Ki-67	MIB-1	Dako	1:100	Melanoma

A reao foi considerada positiva para os anticorpos estudados quando a marcao acastanhada foi encontrada nas células H-RS da forma descrita a seguir:

- CD20: marcação da membrana celular;
- CD15: marcação para-nuclear e/ou da membrana celular;
- CD30: marcação para-nuclear e/ou da membrana celular;
- LMP-1: marcação citoplasmática;
- P53: marcação nuclear;
- BAX: marcação citoplasmática;
- Ki-67: marcação nuclear.

Foi adotado para todos os casos, um sistema semiquantitativo de avaliação da positividade baseado nos escores propostos por Colomo *et al* (2003):

- 1: até 10% de células neoplásicas positivas;
- 2: 11 a 25% de células neoplásicas positivas;
- 3: 26 a 50% de células neoplásicas positivas;
- 4: 51 a 75% de células neoplásicas positivas;
- 5: mais de 75% de células neoplásicas positivas.

Os casos foram considerados positivos quando a marcação característica para cada anticorpo, conforme descrita previamente, foi encontrada no seguinte percentual:

- CD20: qualquer célula neoplásica positiva;
- CD15: qualquer célula neoplásica positiva;
- CD30: qualquer célula neoplásica positiva;
- LMP-1: qualquer célula neoplásica positiva;
- p53: mais de 75% de células neoplásicas positivas (escore 5);
- BAX: mais de 50% de células neoplásicas positivas (escore 4 ou 5);

- Ki-67: mais de 50% de células neoplásicas positivas (escore 4 ou 5).

4.10 Hibridização *in situ* para EBER-1 (EBER-ISH)

A infecção pelo EBV foi também investigada nas amostras de tumor fixados e incluídos em parafina (FIP), pela técnica de hibridização *in situ*, utilizando sondas biotinizadas para o RNA EBER-1 conforme os passos descritos a seguir (Hassan et al, 2006):

a) Desparafinização dos cortes por incubação em xilol na estufa a 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 a 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 biotinizada EBER-1 (Kit de Hibridização *in situ* para o vírus Epstein-Barr, 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 a 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 a temperatura ambiente;

g) O anticorpo anti-FITC conjugado com fosfatase alcalina (diluição 1:200 em solução bloqueante) (Kit de Hibridização *in situ* para o vírus Epstein-Barr, 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) (Kit de Hibridização *in situ* para o vírus Epstein-Barr, 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) Desidratação das lâminas através de banhos sucessivos em álcool de concentração ascendente (etanol 70%, etanol 100%, por 5 minutos), seguido por banho em xilol por 5 minutos;

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 acastanhada. Os casos foram considerados positivos para o EBV quando qualquer uma das células H-RS exibissem a marcação nuclear.

4.11 Extração de DNA

Amostras de tumor FIP foram processadas para obtenção de DNA por métodos padronizados no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO (Stefanoff et al, 2003), a partir de seções microtomizadas de 5 μ m.

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 (SN), o tecido foi secado à temperatura ambiente (TA).

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 H₂O destilada), e proteinase K (200 μ g/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 SN 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 a máxima velocidade, o SN 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/ μ l.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas por espectrofotometria e avaliação em gel de agarose 0.8% após eletroforese.

Antes de realizar as reações de PCR convencional, o DNA extraído foi avaliado utilizando uma reação de PCR multiplex incluindo iniciadores universais

para os genes constitutivos de cópia simples GAPDH, β -globin e α -actin, abrangendo uma faixa de amplificação entre 110 e 454 pb (Stefanoff et al, 2003).

4.12 Detecção e Tipificação do EBV por PCR

A presença e tipificação do EBV (tipo 1 e tipo 2) nas amostras de tumor FIP foi determinada por PCR convencional, utilizando iniciadores para o gene viral EBNA2, utilizando um método padronizada no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO (Hassan et al, 2006).

O método consistiu de uma reação de PCR em ninho (nested-PCR) na qual a primeira etapa inclui iniciadores para uma região do gene EBNA2 comum aos subtipos 1 e 2, enquanto a segunda etapa foi desenhada para amplificar a região que discrimina ambos os subtipos, em reações separadas. O DNA foi amplificado em reações de 50 μ l contendo 1.5 mM $MgCl_2$, 0,3 μ M de cada iniciador, 1U de Platinum *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL) e 5 μ l do DNA obtido do tumor FIP. Ambas as reações tiveram 35 ciclos, com temperatura de “annealing” de 52°C. Os resultados foram avaliados em géis de agarose 2,5%, contendo 0,5 μ g/ml de brometo de etídeo (Gibco BRL) e visualizados sob luz ultravioleta.

Como controles positivos, foi utilizado DNA de alto peso molecular extraído de linhagens celulares EBV-positivas (BC2, EBV de tipo 1; BC1, EBV de tipo 2) e como controle negativo uma linhagem celular EBV negativo (Ramos). Como controle de PCR foi realizada uma reação sem DNA.

4.13 Detecção da Deleção de 30 pb na Região Carboxilo-terminal do Gene LMP1

A detecção da deleção de 30 pb (del30) foi realizada por um método de PCR “seminested”, em que na primeira etapa foram utilizados iniciadores mais externos e a segunda etapa incluiu o *primer* “antisentido” desta primeira etapa (LMP1-AS) e um *primer* “sentido” LMP1-2S (Guidoboni et al, 2005). A segunda etapa foi padronizada para reações de 50 µl, com 2,5 mM de MgCl₂, coadjuvante Triton X-100 0,01%, 0,2 µM dos *primers* específicos e 1,5U da enzima Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen). Para a amplificação, foi estabelecido um perfil térmico “touch-down” que incluiu temperaturas de “annealing” descendentes em um grau por cada 2 ciclos (de 63°C a 56°C), seguido de 15 ciclos à temperatura de “annealing” de 56°C. Os produtos de PCR foram revelados em géis de poliacrilamida 12%, com eletroforese de temperatura controlada (15°C) a 600V em um aparelho GenePhor (Amersham), com marcador de 50pb (50 bp ladder, Invitrogen). O alelo selvagem (sem deleção) foi evidenciado por um produto de PCR de 175 pb, e a presença da del30, por um produto de PCR de 145 pb.

Com a finalidade de se comparar as características moleculares dos isolados do EBV obtidos de células tumorais com os de tecidos não tumorais, foram incluídos nesta parte do estudo 9 amostras de hiperplasias reativas associadas ao EBV, diagnosticadas no INCA no mesmo período, e duas amostras de epitélio orofaríngeo de portadores saudáveis do EBV, considerados então como controles não neoplásicos (CNN).

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 linfoma de Hodgkin 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 Doença (SLD): período, em meses, compreendido entre a documentação da ausência de tumor 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 elaborado a partir da informação registrada nos prontuários médicos pelos clínicos responsáveis pelo tratamento dos pacientes os quais utilizaram exames de imagem, físico e de laboratório.

Para a análise da SLD, conforme a definição previamente exposta, era necessário que houvesse no prontuário médico 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 status de seguimento (recaída, óbito por causas não tumorais ou remissão clínica completa).

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

Para a análise da sobrevida, todos os pacientes foram considerados como se tivessem realizado o mesmo protocolo antineoplásico, uma vez que, conforme mostrado no item 5.11, não houve diferença na SLD e na SG entre os regimes terapêuticos empregados neste estudo. Todos os regimes quimioterápicos utilizados pelos pacientes neste estudo foram baseados nos mesmos princípios terapêuticos (Donaldson e Link, 1987; Freyer et al, 1990; Oberlin et al, 1992; Hudson et al, 1993; Hunger, Link e Donaldson, 1994; Shankar et al, 1997; Weiner et al, 1997; Schellong et al, 1999).

4.15 Análise Estatística

A existência de associações entre variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste de χ^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 e Kruskal-Wallis).

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

O estudo obedeceu 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

5.1 Características Clínicas, Epidemiológicas e Laboratoriais do Grupo Estudado

Foram incluídos no estudo 65 pacientes, diagnosticados durante o período de inclusão do estudo, como observado na figura 5.1.

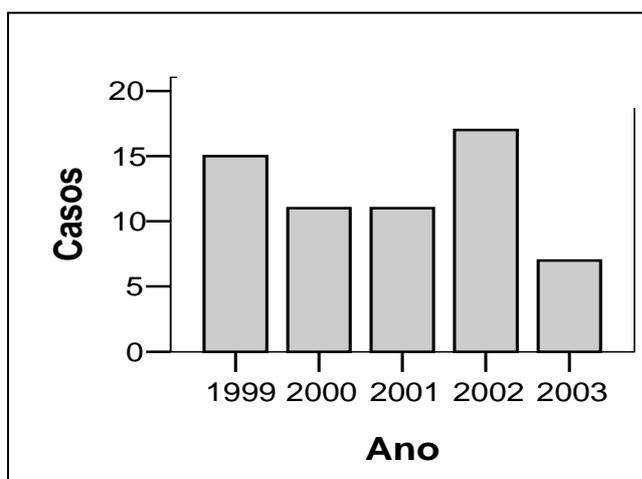


Figura 5.1: Distribuição do número de casos por ano de diagnóstico no INCA.

A idade ao diagnóstico variou de 3 a 18 anos (mediana de 14 anos). O grupo esteve composto predominantemente por crianças de maior idade e adolescentes. Ao se dividir os pacientes por grupo etário (≤ 10 anos versus > 10 anos), 16 crianças (24,6%) pertenceram ao grupo de menor idade, enquanto 49 (75,4%) foram alocadas no grupo de maior idade (Figura 5.2).

Trinta e oito pacientes foram do sexo masculino (58,5%) e 27 do sexo feminino (41,5%), resultando numa relação masculino:feminino (M:F) de 1,4:1. A distribuição dos sexos entre os grupos etários mostrou um predomínio de crianças do sexo masculino tanto no grupo ≤ 10 anos (62,5%; relação M:F 1,6:1), como no grupo > 10 anos (57%; relação M:F 1,3:1).

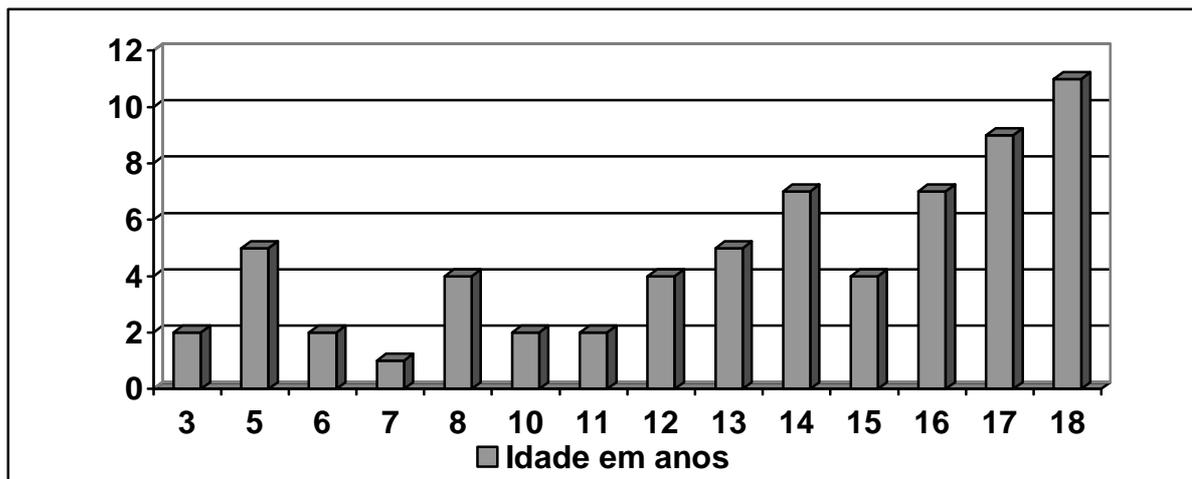


Figura 5.2: Distribuição etária dos casos incluídos no estudo. Número de casos por idade.

Ao se comparar a mediana de idade entre os sexos, foi observado um valor discretamente menor nas crianças do sexo masculino em relação às crianças do sexo feminino (figura 5.3).

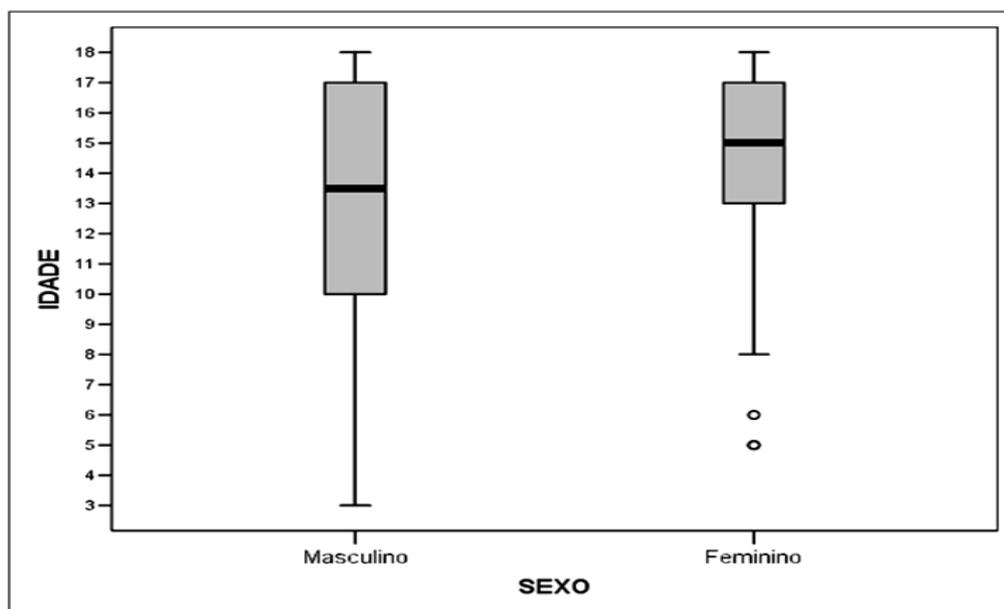


Figura 5.3: Frequência das idades nos grupos de pacientes do sexo masculino e feminino. Gráfico de "Box and Whisker", as barras denotam o intervalo e as caixas a distribuição de quartis em torno da mediana. Círculos representam valores extremos ou "outliers"

A informação quanto à procedência foi encontrada em 61 pacientes. Vinte e cinco casos (41%) foram provenientes do município do Rio de Janeiro, 22 do

interior do Estado do Rio de Janeiro (36%) e 10 casos (16%) da região metropolitana (excetuando-se o município do Rio de Janeiro). Quatro casos eram de outros estados: Ceará, Maranhão, Espírito Santo e Minas Gerais (Figura 5.4). Estes casos foram excluídos nas análises de frequência de associação com o EBV quando se determinou a prevalência do vírus no Estado e município do Rio de Janeiro. A distribuição de casos por localidades, levando-se em consideração o grupo etário, não mostrou diferença estatística ($p=0,2$) (Tabela 5.1).

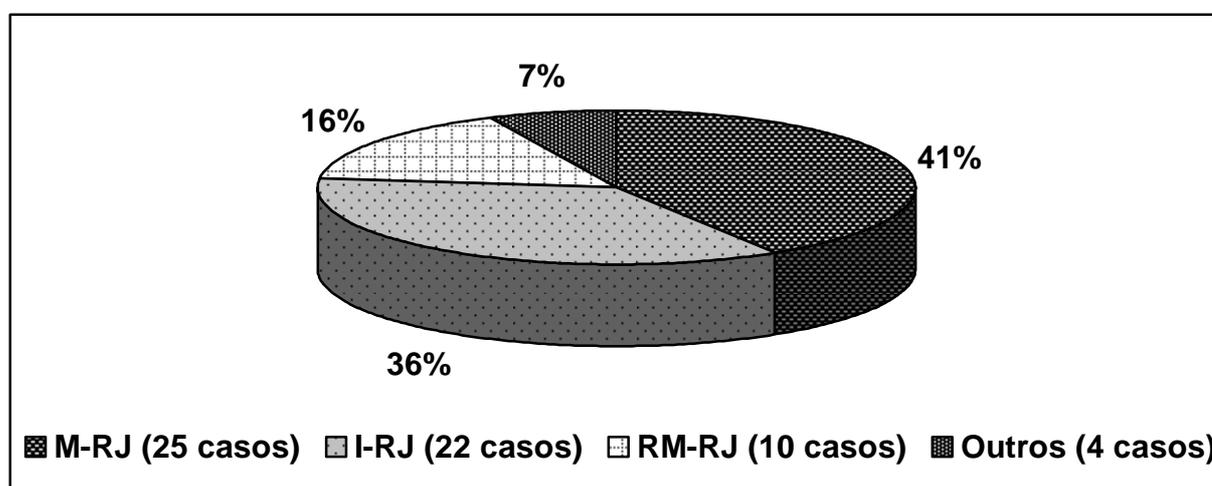


Figura 5.4: Distribuição dos casos por procedência. M-RJ: Município do Rio de Janeiro. I-RJ: Interior do Estado do Rio de Janeiro. RM-RJ: Região metropolitana do Rio de Janeiro, excetuando-se o município.

Tabela 5.1: Distribuição do número de casos quanto à procedência, por grupo etário (≤ 10 anos / > 10 anos).

GRUPO ETÁRIO	PROCEDÊNCIA							TOTAL
	M-RJ	I-RJ	RM-RJ	CE	MA	ES	MG	
≤ 10 anos	5	4	2	0	1	1	0	13
> 10 anos	20	18	8	1	0	0	1	48
TOTAL	25	22	10	1	1	1	1	61

M-RJ: Município do Rio de Janeiro. I-RJ: Interior do Estado do Rio de Janeiro. RM-RJ: Região metropolitana do Rio de Janeiro, excetuando-se o município. CE: Ceará. MA: Maranhão. ES: Espírito Santo. MG: Minas Gerais.

Quanto ao nível sócio-econômico, apenas em 39 pacientes foi possível obter as informações referentes à renda familiar. Trinta e dois casos (82,1%) eram do nível 1 (renda familiar de até 2 salários mínimos) e 7 (17,9%) do nível 2 (renda familiar de 3 a 5 salários mínimos).

O intervalo entre o relato de aparição dos primeiros sinais/sintomas e a matrícula no INCA (intervalo diagnóstico) variou de 6 a 1800 dias (mediana: 120 dias) nos 57 casos analisáveis para esta variável. Deste total, 24 (42,1%) tiveram um intervalo de mais de 120 dias.

Dos 65 casos registrados, 61 tiveram o registro completo dos dados clínicos. A tabela 5.2 mostra um resumo dos dados clínico-laboratoriais dos pacientes estudados.

A presença de sintomas "B" (febre, sudorese noturna e/ou perda de peso) ocorreu em 24 pacientes (39,3%). A esplenomegalia esteve presente em 19 casos (31,1%) e a hepatomegalia em 10 (16,4%). O número de topografias acometidas (cadeias linfonodais, baço e/ou órgão extralinfático) variou de 1 a 9, sendo a mediana de 3 sítios topográficos por paciente.

A massa mediastinal foi avaliável em 60 casos. A maioria dos pacientes (41/60 casos; 68,3%) apresentava este tipo de acometimento.

Os dados referentes ao estadiamento foram encontrados em 61 pacientes. Deste total, 7 foram classificados no estadio I (11,5%), 26 no estadio II (42,6%), 19 no estadio III (31,1%) e 9 no estadio IV (14,8%). A divisão dos casos por grupo de doença (favorável x desfavorável), mostrou uma distribuição equitativa entre os grupos: 31 pacientes (50,8%) eram do grupo favorável, enquanto 30 (49,2%) do grupo desfavorável.

A leucometria foi avaliável em 53 crianças. Vinte e sete (51%) tinham valores normais, 8 (15%) apresentavam leucopenia e 18 (34%) leucocitose. O valor da hemoglobina ao diagnóstico foi encontrado em 50 pacientes; trinta e quatro (68%) exibiam anemia. Os dados da velocidade de hemossedimentação foram obtidos em 32 crianças; em 25 (78,1%) havia aumento deste marcador. Em 43 pacientes, foram encontrados os dados referentes à desidrogenase láctica ao diagnóstico. O aumento ocorreu em 18 casos (41,9%).

Tabela 5.2: Dados clínico-laboratoriais do grupo de pacientes pediátricos com linfoma de Hodgkin estudados.

VARIÁVEL	NÚMERO DE CASOS	VALOR PERCENTUAL
Visceromegalia		
Esplenomegalia	Sim: 19	31,1%
	Não: 42	68,9%
	Total: 61	Total: 100%
Hepatomegalia	Sim: 10	16,4%
	Não: 42	83,6%
	Total: 52	Total: 100%
Massa Mediastinal	Sim: 41	68,3%
	Não: 19	31,7%
	Total: 60	Total: 100%
Estadiamento		
I	7	11,5%
II	26	42,6%
III	19	31,1%
IV	9	14,8%
	Total: 61	Total: 100%
Sintomas		
A	37	60,7%
B	24	39,3%
	Total: 61	Total: 100%
Grupos		
Favorável	31	50,8%
Desfavorável	30	49,2%
	Total: 61	Total: 100%
Leucometria		
Normal	27	50,9%
Diminuída	8	15,1%
Aumentada	18	34%
	Total: 53	Total: 100%
Hemoglobina		
Normal	16	32%
Diminuída	34	68%
	Total: 50	Total: 100%
VSH		
Normal	7	21,9%
Aumentado	25	78,1%
	Total: 32	Total: 100%
DHL		
Normal	25	58,1%
Aumentado	18	41,9%
	Total: 43	Total: 100%

5.2 Perfil Histológico dos Linfomas de Hodgkin Estudados

Dos 65 casos de linfoma de Hodgkin, 64 tiveram o diagnóstico realizado no linfonodo e em um caso na biópsia de medula óssea. Desta forma, a avaliação do subtipo histológico e do grau de envolvimento interfolicular foi procedida nos primeiros 64 casos. A tabela 5.3 mostra um resumo dos subtipos histológicos, subtipos da esclerose nodular, grau da esclerose nodular e padrão interfolicular nos 64 linfonodos analisados.

O subtipo EN foi o mais freqüente, sendo encontrado em 53 casos (82,8%). Oito casos (12,5%) eram de CM e 3 casos (4,7%) de DL (Figura 5.6).

A EN grau I e grau II tiveram freqüências semelhantes: 26 (49,1%) e 27 casos (50,9%), respectivamente (Figura 5.7). Quanto aos subtipos da EN, a maioria dos casos era de EN-celularide mista (29 casos; 54,7%), seguido do EN-rico em linfócitos (13 casos; 24,5%) e da EN-depleção linfocitária (11 casos; 20,8%).

A estimativa semiquantitativa do grau de envolvimento interfolicular pelo linfoma de Hodgkin mostrou a seguinte distribuição:

- Ausência de folículo residual (escore 0): 31 casos (46,9%);
- Folículo remanescente e/ou ocasionais folículos com centros germinativos (escore 1): 24 casos (37,5%);
- Freqüentes folículos residuais com centros germinativos e infiltrado tumoral interfolicular (escore 2): 9 casos (14,1%);
- Hiperplasia folicular extensiva com infiltrado tumoral interfolicular (escore 3): 1 caso (1,6%).

Baseado no escore, o padrão de envolvimento interfolicular foi encontrado em 10 casos (15,4%).

Tabela 5.3: Descrição dos subtipos histológicos, subtipos da esclerose nodular, grau da esclerose nodular e padrão interfolicular nos 64 linfonodos analisados.

VARIÁVEL	NÚMERO DE CASOS	VALOR PERCENTUAL
Subtipo Histológico		
EN	53	82,8
CM	8	12,5
DL	3	4,7
Subtipo da EN		
CM	29	54,7
DL	11	20,8
RL	13	24,5
Grau da EN		
I	26	49,1
II	27	50,9
Padrão Interfolicular		
Sim	10	15,4
Não	54	84,6

EN: Esclerose nodular. CM: Celularidade mista. DL: Depleção linfocítica. RL: Rico em linfócito.

O número de células H-RS variou de 5 a 307 por 10 CGA (mediana: 40 células). Ao se dividir os pacientes em um grupo com até 40 células por 10CGA e outro com mais de 40 células por 10 CGA, obteve-se uma distribuição semelhante: 34 pacientes (52,3%) com até 40 células por 10CGA e 31 pacientes (47,7%) com mais de 40 células por 10 CGA (Figura 5.7: B, C, D).

O número de mitose nas células H-RS variou de 0 a 71 por 10 CGA (mediana: 4 células em mitose). 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). A maioria dos pacientes se encontrava incluída no grupo 1 (52 casos, 80%) e apenas 13 casos (20%) faziam parte do grupo 2 (Figura 5.7: C).

O número de eosinófilos variou de 0 a 3600 por 10 CGA (mediana: 36 eosinófilos). A divisão dos casos tomando como base a mediana, mostrou distribuição semelhante: 33 casos (50,8%) com até 36 eosinófilos por 10 CGA e 32 casos (49,2%) com mais de 36 eosinófilos por 10 CGA. A estratificação pela intensidade do infiltrado eosinofílico mostrou 23 casos (35,4%) com infiltrado eosinofílico leve, 25 moderado (38,5%) e 16 acentuado (26,2%) (Figura 5.7: C, F). Estes resultados encontram-se resumidos na tabela 5.4.

A grande maioria dos linfonodos analisados não apresentava necrose (54 casos, 84,4%) e apenas 10 casos (15,6%) a exibiam (Figura 5.7: E).

Tabela 5.4: Descrição do número de células H-RS, mitose e eosinófilos encontrados em 10 CGA.

VARIÁVEL	FAIXA	MEDIANA	GRUPOS	VALORES
Células H-RS em 10 CGA	5 a 307	40	≤ 40	34 (52,3%)
			> 40	31 (47,7%)
Mitose em 10 CGA	0 a 71	4	≤ 10	52 (80%)
			>10	13 (20%)
Eosinófilos em 10 CGA	0 a 3600	36	≤ 36	50,8%
			> 36	49,2%

H-RS: Células de Hodgkin e Reed-Sternberg. CGA: Campo de grande aumento.

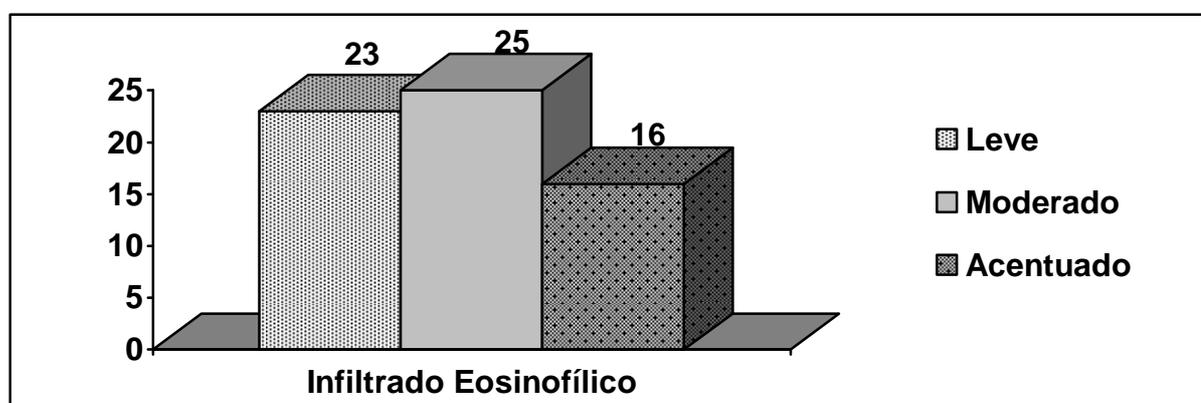


Figura 5.5: Distribuição dos casos quanto à intensidade do infiltrado eosinofílico.

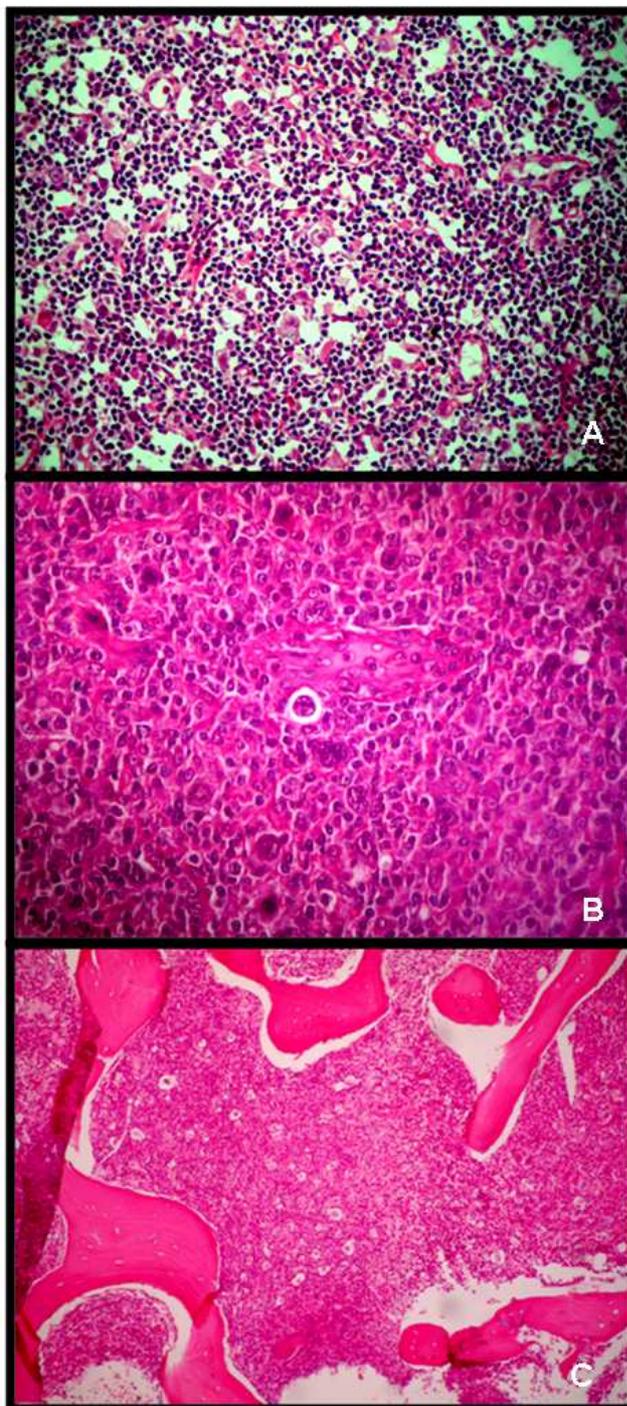


Figura 5.6: Características histológicas de alguns casos de linfoma de Hodgkin incluídos neste estudo. A) Linfoma de Hodgkin celularidade mista com células de Hodgkin e Reed-Sternberg no centro do campo (caso 34). HE, 400x. B) Linfoma de Hodgkin depleção linfocitária com célula de Reed-Sternberg no centro do campo (caso 61). HE, 400x. C) Medula óssea comprometida por linfoma de Hodgkin. Neste aumento é possível notar numerosas células lacunares (caso 30). HE, 400x.

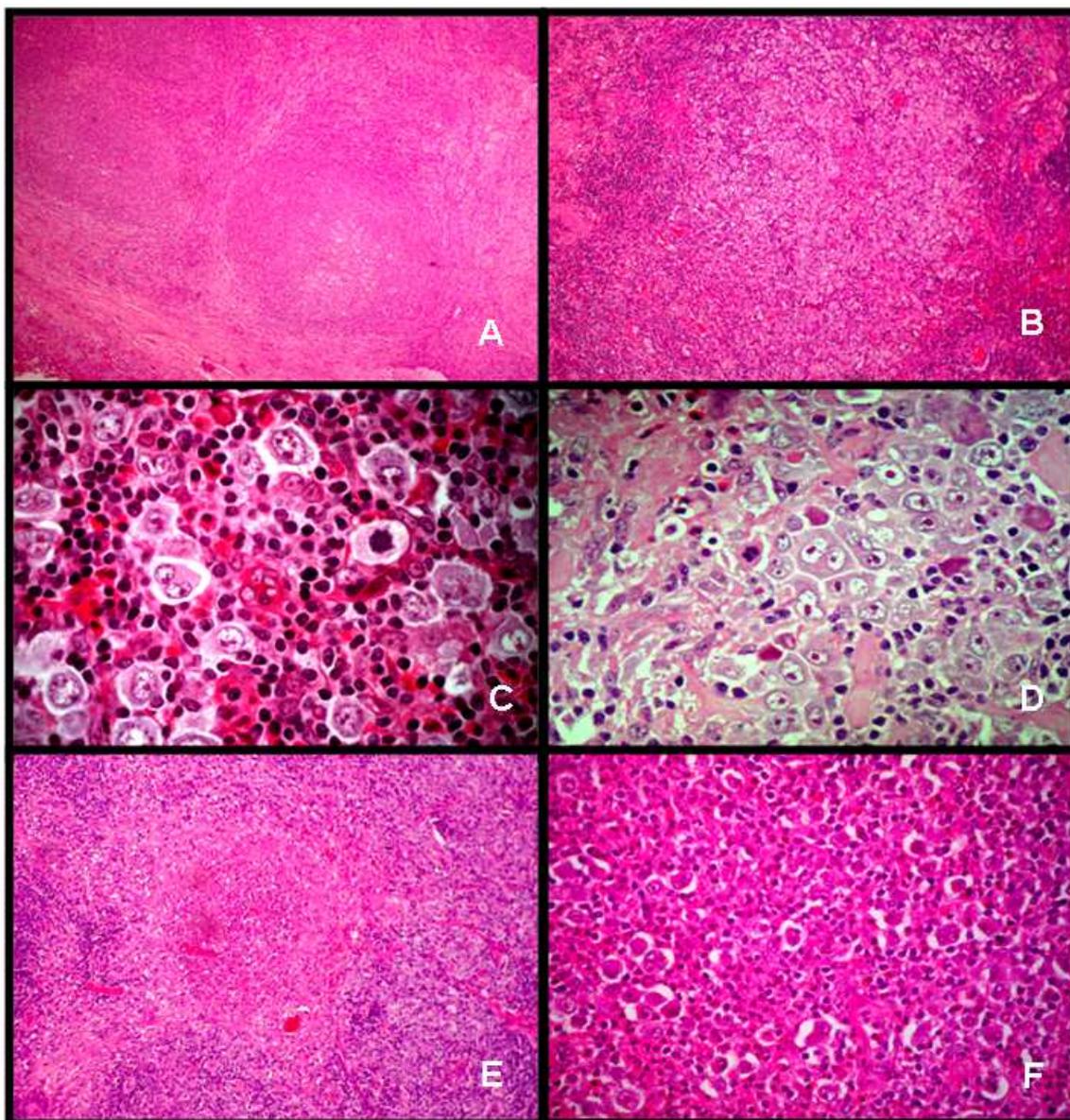


Figura 5.7: Mais exemplos de características histológicas encontradas nos casos de linfoma de Hodgkin incluídos neste estudo. A) Linfoma de Hodgkin esclerose nodular grau II (caso 28). HE, 40x. B) Exemplo de caso com grande número de células neoplásicas (caso 4). HE, 40x. C) Exemplo de caso rico em células de Hodgkin e Reed-Sternberg, mitose e infiltrado eosinofílico (caso 32). HE, 1000x. D) Linfoma de Hodgkin com grande número de células de Hodgkin e Reed-Sternberg (caso 16). HE, 400x. E) Centro do campo com área de necrose (caso 4). HE, 100x. F) Exemplo de caso com grande infiltrado eosinofílico (caso 28). HE, 400x.

5.3 Perfil Imunofenotípico dos Linfomas de Hodgkin Estudados

A imunoposição do CD30 nas células H-RS foi analisada por dois métodos com sensibilidades diferentes. Quando utilizado o Kit LSAB+ (DakoCytomation V.G.), a expressão do CD30 foi encontrada em 49 casos (75,4%).

Quando a expressão do CD30 foi analisada no TMA, desta vez utilizando-se para a visualização o Kit EnVision+ (DakoCytomation V.G.), 55/57 foram avaliáveis para o CD30. Em 52 crianças (94,5%), foi observada positividade; 3 casos (5,5%) não expressaram CD30. Combinando os resultados do CD30, a positividade final foi de 89,2% (58 casos).

Os resultados da imunoposição do CD30 por cada método, assim como os resultados combinados de ambos são mostrados na tabela 5.5.

Tabela 5.5: Frequência dos casos distribuídos quanto ao percentual de células neoplásicas CD30+, de acordo às técnicas de revelação empregadas.

% DE CÉLULAS POSITIVAS	Nº DE CASOS (%) (LSAB)*	Nº DE CASOS (%) (ENVISION)**	Nº FINAL DE CASOS (%)
≤ 10%	8 (16)	0 (0)	1 (1,7)
11 a 25%	7 (14)	0 (0)	-
26 a 50%	12 (25)	3 (6,8)	3 (5,2)
51 a 75%	5 (10)	5 (9,6)	7 (12,1)
> 75%	17 (35)	44 (84,6)	47 (81)
TOTAL	49 (100)	52 (100)	58 (100)

Nº: número. *: Técnica de revelação utilizando o Kit LSAB+, HRP DakoCytomation. **: Técnica de revelação utilizando o Kit EnVision+, HRP DakoCytomation.

O padrão de marcação exibido pelo CD30 com a utilização dos dois kits foi semelhante (membrana e/ou paranuclear), diferindo na intensidade da marcação e no número de células H-RS positivas (Figura 5.8).

A imunopositividade do CD15 nas células H-RS foi encontrada em 43 casos (66,2%), enquanto 22 (33,8%) foram negativos para o referido anticorpo. O

padrão de marcação encontrado foi de membrana, paranuclear ou uma combinação de ambos (Figura 5.9 A-C).

O CD20 foi encontrado em 18 casos (27,7%), sendo a maioria dos pacientes (47 casos, 72,3%) negativos para este anticorpo. O padrão de marcação encontrado em todos os casos foi o de membrana (Figura 5.9 D-F).

A distribuição dos casos quanto ao número de células neoplásicas expressando os marcadores celulares CD15 e CD20 é mostrada na tabela 5.6. Na tabela 5.7, por sua vez, é apresentado um resumo do perfil imunofenotípico dos casos avaliados.

Tabela 5.6: Freqüência dos casos de linfoma de Hodgkin distribuídos nos grupos definidos pelo percentual de células neoplásicas CD15+ e CD20+.

% DE CÉLULAS POSITIVAS	Nº DE CASOS CD15+ (%)	Nº DE CASOS CD20+ (%)
≤ 10%	13 (30,2)	5 (27,8)
11 a 25%	1 (2,3)	3 (16,7)
26 a 50%	12 (27,9)	1 (5,6)
51 a 75%	2 (4,7)	0 (0)
> 75%	15 (34,9)	9 (50)
TOTAL	43 (100)	18 (100)

Tabela 5.7: Imunofenótipo dos casos de linfoma de Hodgkin estudados

ANTICORPO	Nº DE CASOS	POSITIVO	NEGATIVO
CD30*	65	58 (89,2%)	7 (10,8%)
CD15	65	43 (66,2%)	22 (33,8%)
CD20	65	18 (27,7%)	47 (72,3%)

* São considerados os valores obtidos da combinação de ambas as técnicas utilizadas

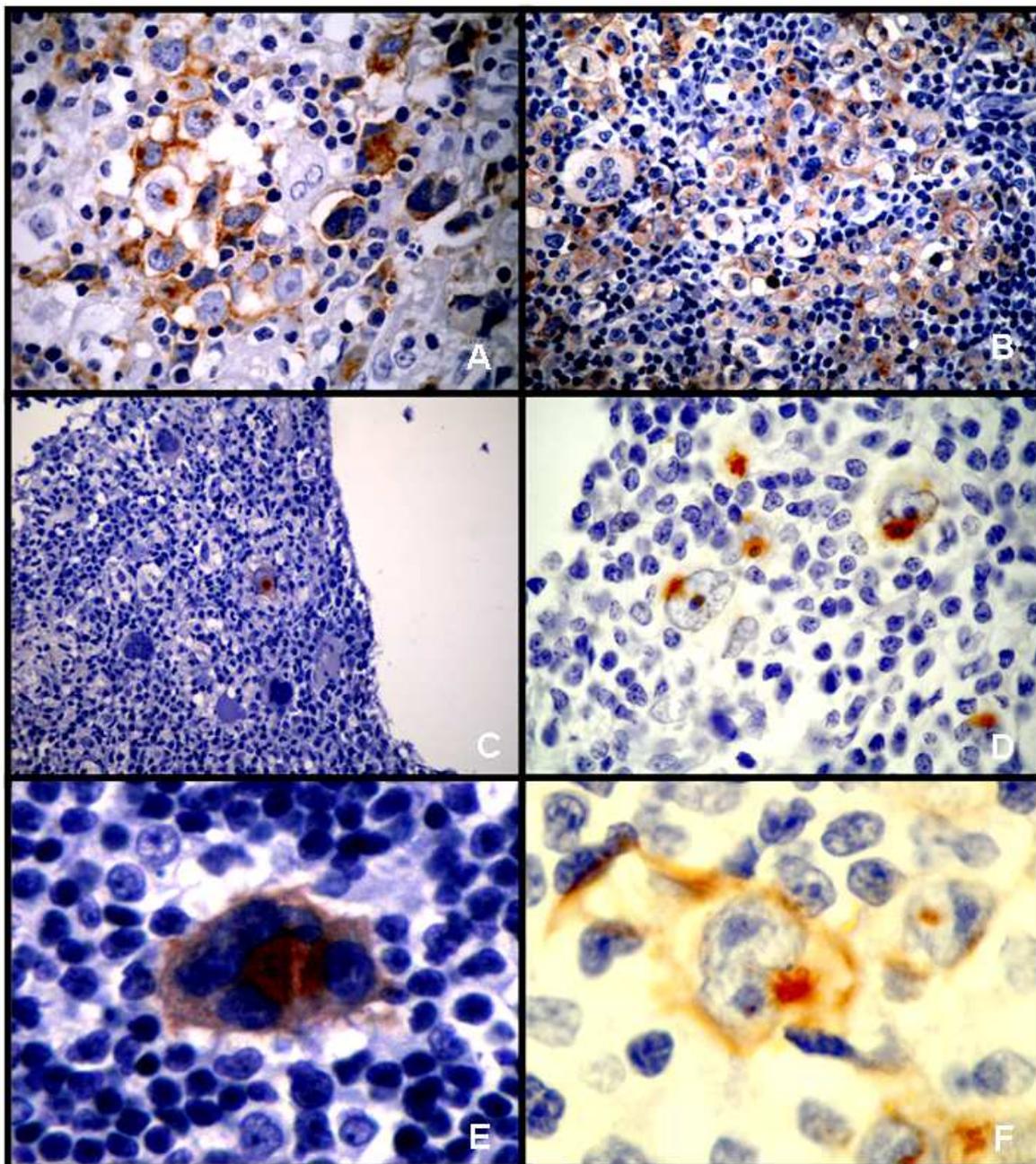


Figura 5.8: Exemplos de casos imunopositivos para o CD30. A) Células de Hodgkin e Reed-Sternberg positivas para o CD30, mostrando marcação de membrana e/ou paranuclear (caso 5). 1000x. B) Campo com grande número de células neoplásicas (células de Hodgkin, Reed-Sternberg e multinucleada) positivas para o CD30 (caso 62). 400x. C) Biópsia de medula óssea mostrando célula de Reed-Sternberg positiva para o CD30 (caso 30). 400x. D) Células de Hodgkin positivas para o CD30, mostrando marcação paranuclear (caso 55). 1000x. E) Célula neoplásica multinucleada positiva para o CD30, mostrando marcação de membrana e paranuclear (caso 59). 1000x. F) Célula de Reed-Sternberg positiva para o CD30, mostrando marcação de membrana e paranuclear (caso 59). 1000x.

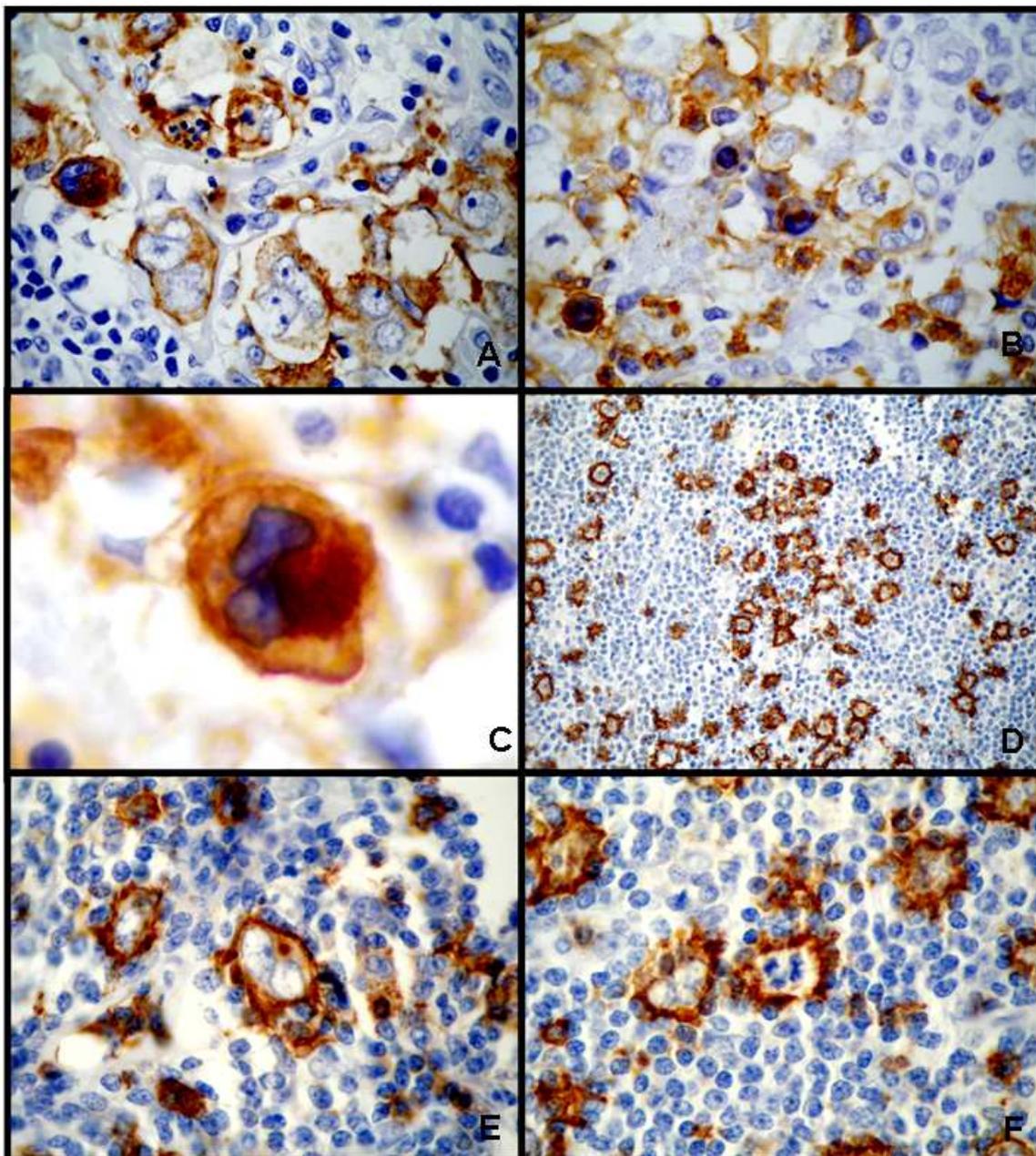


Figura 5.9: Exemplos de casos positivos para o CD15 e CD20. A) Células de Hodgkin e Reed-Sternberg mostrando marcação de membrana e/ou paranuclear para o CD15 (caso 47). 1000x. B) Células de Hodgkin, Reed-Sternberg e mumificadas positivas para o CD15 (caso 60). 1000x. C) Célula de Reed-Sternberg positiva para o CD15 (caso 29). 1000x. D) Células de Hodgkin e Reed-Sternberg positivas para o CD20 (caso 40). 400x. E) Centro do campo com célula de Reed-Sternberg mostrando marcação de membrana e paranuclear para o CD20 (caso 40). 1000x. F) Centro do campo com célula neoplásica positiva para o CD20 e exibindo mitose tripolar (caso 40).

5.4 Imunoexpressão do p53, BAX e Ki-67

O estudo imunohistoquímico do p53, Bax e Ki-67 foi realizado nas lâminas do TMA. Como já descrito anteriormente, o estudo destes anticorpos só foi possível em 57 casos.

A imunoexpressão de p53 foi avaliável em 56 casos. Deste total, 45 pacientes (80,4%) apresentaram positividade em alguma célula neoplásica, enquanto 11 pacientes (19,6%) foram completamente negativas. Os casos só foram considerados positivos quando exibissem a marcação em mais de 75% das células neoplásicas. Desta forma, 25 casos (44,6%) foram positivos para a expressão de p53 e os outros 31 casos (55,4%) foram considerados como negativos (tabela 5.8). Todos os casos apresentaram marcação nuclear característica (Figura 510: A,B).

Tabela 5.8: Expressão de p53 de acordo com o percentual das células neoplásicas positivas.

% DE CÉLULAS POSITIVAS	NÚMERO DE CASOS	VALOR PERCENTUAL	RESULTADO FINAL
≤ 10%	7	15,6%	Negativo
11 a 25%	0	0%	-
26 a 50%	3	6,7%	Negativo
51 a 75%	10	22,2%	Negativo
> 75%	25	55,6%	Positivo
TOTAL	45	100%	-

A imunoexpressão do BAX foi avaliável em 54 casos. Do total de casos, 48 (88,9%) apresentaram algum grau de expressão nas células neoplásicas, enquanto 6 casos (11,1%) foram completamente negativos. Considerou-se como 51% o percentual mínimo de células neoplásicas marcadas pelo anticorpo para que o caso fosse chamado de positivo. Assim, 36 casos (68,5%) foram considerados como positivos e 17 (31,5%) como negativos (tabela 5.9).

Tabela 5.9: Expressão de BAX de acordo com o percentual das células neoplásicas positivas.

% DE CÉLULAS POSITIVAS	NÚMERO DE CASOS	VALOR PERCENTUAL	RESULTADO FINAL
≤ 10%	8	16,7%	Negativo
11 a 25%	1	2,1%	Negativo
26 a 50%	3	6,3%	Negativo
51 a 75%	6	12,5%	Positivo
> 75%	30	62,5%	Positivo
TOTAL	48	100%	-

Todas as células neoplásicas que imunoexpressaram o BAX apresentaram a marcação citoplasmática característica (Figura 5.10: C,D).

O Ki-67 foi avaliável em 56 pacientes. Cinquenta e três casos (94,6%) apresentaram algum grau de imunoexpressão, sendo que 28 pacientes (50%) mostraram “alto índice de proliferação celular” ($\geq 51\%$ das células H-RS positivas) e 28 (50%) baixo índice ($\leq 50\%$ de células positivas, incluindo os negativos). A tabela 5.10 mostra a distribuição percentual das células neoplásicas positivas para o Ki-67. A marcação para o Ki-67 em todos os casos foi, caracteristicamente, a nuclear (Figura 5.10: E,F).

Tabela 5.10: Expressão do Ki-67 de acordo com o percentual das células neoplásicas positivas.

% DE CÉLULAS POSITIVAS	NÚMERO DE CASOS	VALOR PERCENTUAL	RESULTADO FINAL
≤ 10%	14	26,4%	BIPC
11 a 25%	6	11,3%	BIPC
26 a 50%	5	9,4%	BIPC
51 a 75%	16	30,2%	AIPC
> 75%	12	22,6%	AIPC
TOTAL	53	100%	-

BIPC: Baixo índice de proliferação celular. AIPC: Alto índice de proliferação celular.

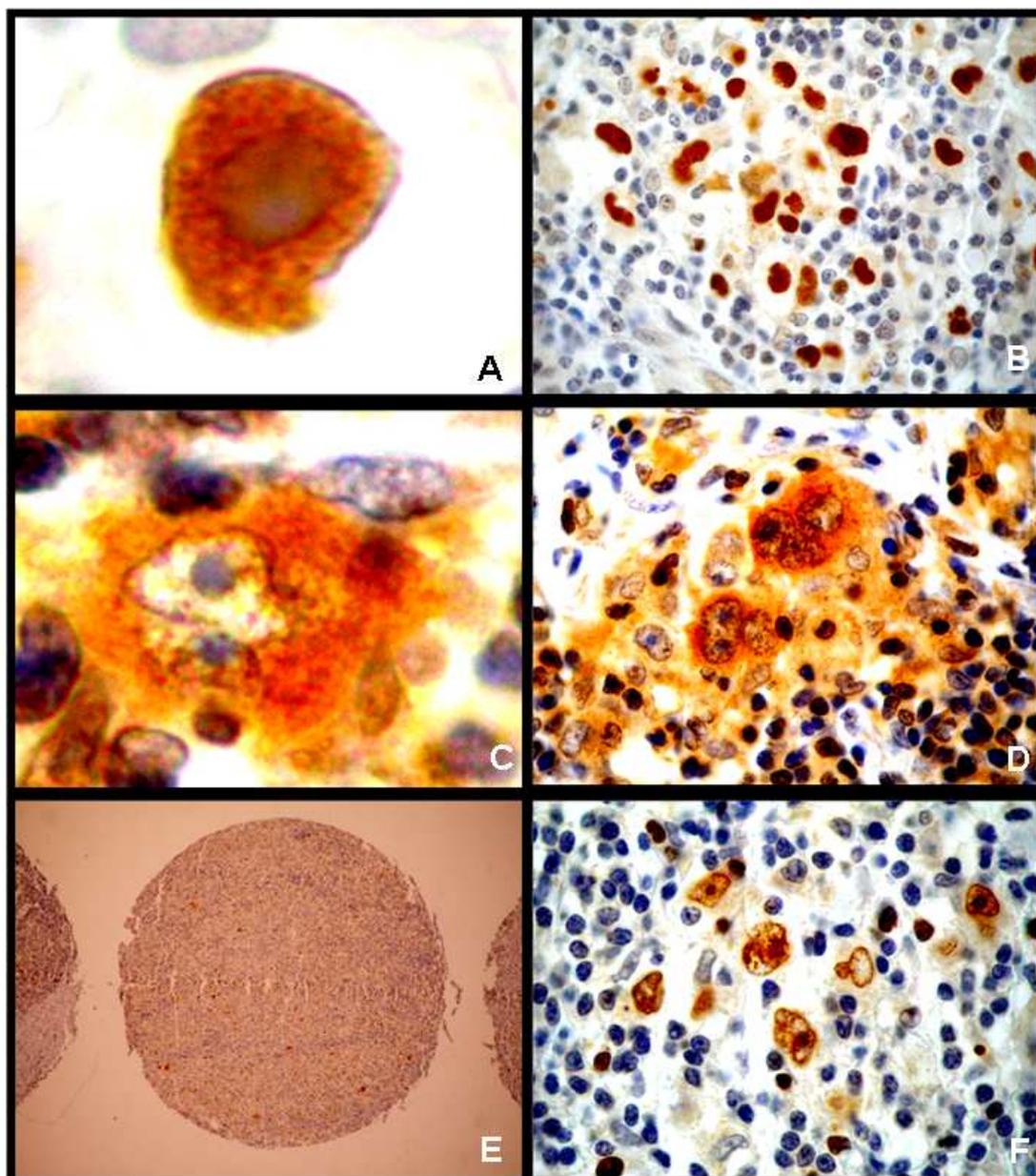


Figura 5.10: Exemplos de casos com imunoexpressão do p53, BAX e Ki-67. A) Célula de Hodgkin positiva para p53 com sua marcação nuclear característica (caso 61). 1000x. B) Campo com grande número de células neoplásicas (células de Hodgkin, Reed-Sternberg e multinucleada) positivas para p53 (caso 61). 400x. C) Célula de Reed-Sternberg positiva para Bax com sua marcação citoplasmática característica (caso 63). 1000x. D) Células neoplásicas positivas para BAX (caso 51). 1000x. E) Pequeno aumento mostrando cilindro cujos pontos castanhos representam células neoplásicas positivas para Ki-67 (caso 65). 100x. F) Célula de Hodgkin e Reed-Sternberg positivas para Ki-67 com sua marcação nuclear característica (caso 65). 400x.

A tabela 5.11 mostra resumidamente o percentual de casos positivos para p53, BAX e Ki-67.

Tabela 5.11: Padrões de expressão de p53, Bax e Ki-67 nos linfomas de Hodgkin estudados.

ANTICORPO	Nº DE CASOS	RESULTADO
p53	56	Positivo: 25 (44,6%) Negativo: 31 (55,4%)
BAX	54	Positivo: 37 (68,5%) Negativo: 17 (31,5%)
Ki-67	56	Alto Índice PC: 28 (50%) Baixo Índice PC: 25 (50%)

PC: Proliferação celular.

5.5 Avaliação da Eficiência dos Métodos Convencionais e TMA no Estudo Imunohistoquímico no Linfoma de Hodgkin

Como referido anteriormente, dos 65 casos incluídos neste estudo, 57 tiveram material disponível para a construção do TMA. Foram coletados 2 cilindros de tumor FIP por paciente. O bloco doador foi cortado em quantidade suficiente para se produzir 100 lâminas. Para cada 10 lâminas, uma lâmina foi corada com HE a fim de se avaliar a representatividade da neoplasia nos diversos níveis do bloco doador.

As células H-RS estiveram presentes em 56 (98%) dos 57 casos em todos os níveis avaliados. O número de células neoplásicas por cada caso construído através do TMA foi suficiente para garantir a representatividade do linfoma. A duplicação dos cores incluídos no TMA permitiu ainda que um maior número de casos fosse avaliável nos estudos imunohistoquímicos, representando um aumento significativo da eficiência da abordagem metodológica, em todos os anticorpos analisados, como mostrado na tabela 5.12.

Tabela 5.12: Análise comparativa da eficiência do TMA para cada anticorpo com e sem a inclusão de amostras duplicadas.

	CD30	BAX	KI-67	P53
CASOS AVALIÁVEIS SEM DUPLICATA	51	43	49	43
CASOS AVALIÁVEIS COM DUPLICATA	55	54	55	56
AUMENTO PERCENTUAL	7,8%	25,5%	12%	30,2%
PROBABILIDADE (χ^2)	< 0,001	0,001	< 0,001	0,07

5.6 Características Histológicas e Clínicas dos Linfomas de Hodgkin

Estudados

Neste estudo, foram observadas associações significativas de algumas características histológicas com subtipos histológicos e também com aspectos clínicos da doença, conforme descrito a seguir.

5.6.1 Características Histológicas dos Subtipos do Linfoma de Hodgkin

Os subtipos histológicos mostraram uma tendência de associação com o número de células neoplásicas em 10 CGA. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: um com até 40 células H-RS em 10 CGA e outro com mais de 40 destas células em 10 CGA. Os casos de CM mostraram tendência de um menor *pool* de células neoplásicas em 10 CGA ($p=0,08$) (Figura 5.11).

O índice mitótico (≤ 10 mitoses por 10 CGA versus > 10 mitoses por 10 CGA) também mostrou tendência de associação com o subtipo histológico. Os casos de EN tenderam a um menor índice mitótico, enquanto os casos de CM tiveram distribuição eqüitativa entre os 2 grupos de proliferação celular ($p= 0,06$) (Figura 5.12).

Não houve correlação dos subtipos histológicos com imunofenótipo, p53, BAX, Ki-67, intensidade do infiltrado eosinofílico, padrão interfolicular, necrose, estadiamento, grupo de risco da doença, tempo de evolução da doença até o diagnóstico, características clínicas, sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Os subtipos da EN também não mostraram associações com as variáveis estudadas.

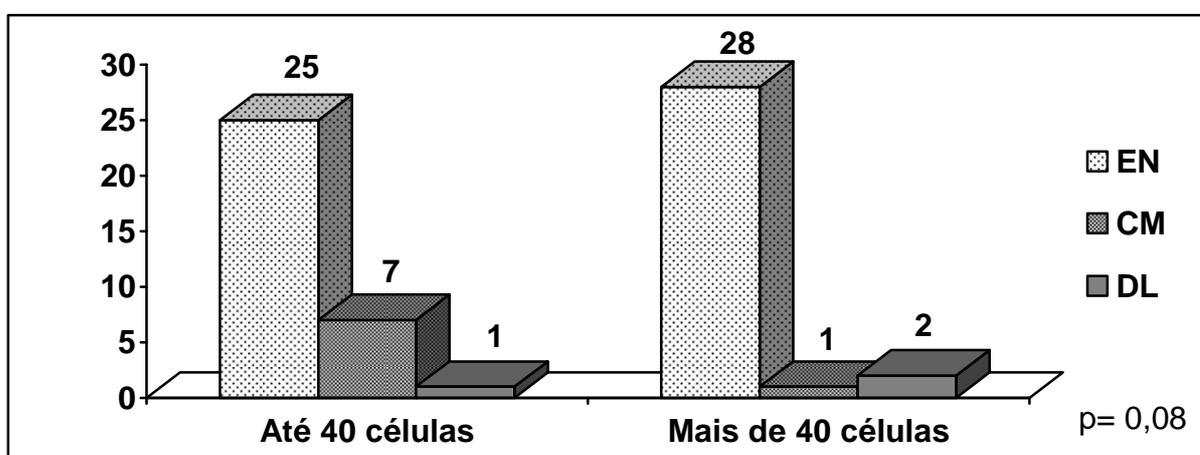


Figura 5.11: Associação entre o subtipo histológico e o número de células neoplásicas em 10 CGA. EN: Esclerose nodular. CM: Celularidade mista. DL: Depleção linfocitária

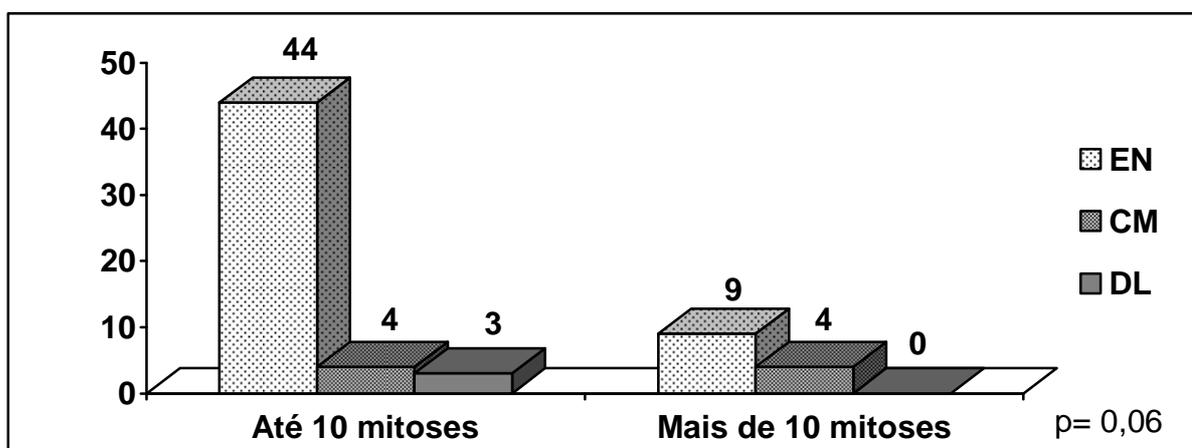


Figura 5.12: Associação entre o subtipo histológico e o número de mitoses em 10 CGA. EN: Esclerose nodular. CM: Celularidade mista. DL: Depleção linfocitária.

5.6.2 Número de Células Neoplásicas

O número de células neoplásicas apresentou associação com vários fatores clínicos e histológicos, apresentados na tabela 5.13. Como esperado, o número de células neoplásicas esteve associado ao grau da esclerose nodular. Desta forma, 81,4% de todos os casos de esclerose nodular grau II apresentaram mais de 40 células H-RS por 10 CGA ($p= 0,00002$).

O número de células H-RS esteve inversamente relacionado ao índice de proliferação celular (escore do Ki-67 ≥ 4). Dos 56 casos avaliáveis para esta associação, 30 apresentavam até 40 células H-RS por 10 CGA e deste total, 19 (63,3%) apresentavam alto índice de proliferação celular. Ainda em relação ao número de pacientes avaliáveis, 26 exibiram mais de 40 células H-RS por 10 CGA e deste grupo, apenas 9 (34,6%) tiveram alto índice de proliferação celular ($p= 0,03$).

O estudo da associação entre o número de células H-RS e o grupo de risco da doença foi possível em 61 casos. Observou-se que dos 30 casos alocados no grupo da doença desfavorável, 20 (66,6%) apresentavam um maior número de células neoplásicas em 10 CGA ($p= 0,01$).

O número de células neoplásicas também esteve associado diretamente à presença de massa mediastinal. Sessenta casos foram avaliáveis para este tipo de associação. Dos 30 casos com mais de 40 células H-RS por 10 CGA, 25 (83,3%) apresentavam massa mediastinal ($p= 0,01$).

Observou-se ainda associação positiva entre o número de células neoplásicas e a presença de sintomas B. Dos 24 pacientes com sintomas (num universo de 61 pacientes analisáveis para esta variável), 67% tinham mais de 40 células H-RS em 10 CGA. Já dos 37 pacientes sem sintomas B, 59% tinham uma menor quantidade de células neoplásicas ($p= 0,04$).

Tabela 5.13: Associação entre o número de células H-RS, variáveis histológicas e clínicas.

VARIÁVEL	Nº CÉLULAS H-RS*		PROBABILIDADE**
	≤ 40	> 40	
Grau da EN			
I	20	6	0,00002
II	5	22	
Escore do Ki-67			
< 4	11	17	0,03
≥ 4	19	9	
Grupo de Risco			
Favorável	20	11	0,01
Desfavorável	10	20	
Massa Mediastinal			
Sim	16	25	0,01
Não	40	5	
Sintomas			
A	22	15	0,04
B	8	16	

H-RS: células de Hodgkin e Reed -Sternberg. * Número de células H-RS em 10 CGA. **Teste Exato de Fisher. EN: Esclerose nodular.

Não houve correlação entre o número de células H-RS e o número de mitoses em 10 CGA, padrão interfolicular, necrose, intensidade do infiltrado eosinofílico, imunofenótipo, p53, Bax, tempo de evolução da doença até o diagnóstico, características clínicas (excetuando-se a massa mediastinal) e estadiamento.

A regressão logística das variáveis que se associaram significativamente ao número de células neoplásicas é mostrada na tabela 5.14. O grau da EN continuou associado ao maior número de células neoplásicas (≥40 células H-RS em 10 CGA), enquanto o alto índice mitótico, o grupo de risco, a massa mediastinal e a presença de sintomas B perderam significação estatística.

Tabela 5.14: Regressão logística entre o número de células neoplásicas* e o grau da EN, o alto índice de proliferação celular, o grupo de risco e a massa mediastinal.

VARIÁVEL	B ⁺	SIGNIFICAÇÃO (p) ⁺⁺	OR	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
Grau da EN	-3,29	0,002	0,04	0,005-0,295
Alto Índice Mitótico**	1,13	0,221	3,11	0,5-19,18
Grupo de Risco	-1,28	0,504	0,28	0,006-11,88
Massa Mediastinal	-0,89	0,417	0,41	0,47-3,56
Sintomas	-0,44	0,817	0,64	0,15-27,65

* Número de células neoplásicas em 10 CGA (≤ 40 versus > 40); ** $\geq 51\%$ de células neoplásicas positivas para o Ki-67; EN: Esclerose nodular. + Resultado da regressão logística. ++ Valor da significação da regressão logística.

5.6.3 Número de Mitoses

O número de mitoses só esteve relacionado ao grau da EN. Para esta associação, 53 casos foram avaliados e deste total, apenas 9 tiveram mais de 10 mitoses por CGA. Destes 9 pacientes, 8 eram de esclerose nodular grau II ($p= 0,01$) (Tabela 5.15).

Não foi encontrada associação entre o número de mitoses e subtipo da esclerose nodular, número de células H-RS, padrão interfolicular, necrose, infiltrado eosinofílico, imunofenótipo, p53, Bax, Ki-67, estadiamento, grupo de risco, intervalo entre o início dos sinais/sintomas e o diagnóstico, características clínicas, sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Tabela 5.15: Associação entre o número de mitoses em 10 CGA e o grau da esclerose nodular.

Nº DE MITOSE EM 10 CGA	GRAU DA ESCLEROSE NODULAR		TOTAL
	I	II	
≤ 10	25	19	44
> 10	1	8	9
TOTAL	26	27	53

* p= 0,01

A regressão logística mostrou uma tendência para a associação entre o número de mitoses e o grau da EN (p=0,07, OR 0,1, IC 95% 0,008-1,25). Por outro lado, não foi observada associação entre o número de mitoses e o número de células H-RS em 10 CGA (p=0,8).

5.6.4 Padrão Interfolicular

A presença do padrão interfolicular só se correlacionou com o intervalo entre o início dos sinais/sintomas e o diagnóstico. Dos 10 pacientes com o referido padrão, 8 (80%) tinham mais de 120 dias de intervalo (p= 0,008). O contrário também foi observado, ou seja, dos 47 casos sem o padrão interfolicular, a maioria (31 pacientes, 66%) tinham menos de 120 dias de intervalo.

Entretanto, a regressão logística mostrou somente uma tendência de associação entre padrão interfolicular e intervalo diagnóstico (> 120 dias) (p= 0,087).

5.7 Características Histológicas e Clínicas Associadas à Imunoexpressão dos Anticorpos Estudados

O imunofenótipo das células H-RS mostrou, na análise univariada, associação com características histológicas e clínicas do linfoma de Hodgkin, conforme descrito a seguir. Somente a expressão de Bax, p53 e Ki-67 apresentaram

correlações significativas com características histológicas e clínicas que se mantiveram ou tenderam a significância na regressão logística multivariada.

5.7.1 Imunoexpressão do CD20

O linfoma de Hodgkin com imunofenótipo CD20 positivo se mostrou associado inversamente ao infiltrado eosinofílico. Tanto a divisão dos casos pela mediana de Eo em 10 CGA (36 eosinófilos), quanto a estratificação por intensidade do infiltrado eosinofílico mostraram correlação inversa com o CD20.

Dos 18 casos CD20 positivos, 13 (72,2%) apresentavam menos de 36 Eo por 10 CGA. Por outro lado, dos 47 casos CD20 negativos, 27 (57,4%) apresentavam mais de 36 Eo por 10 CGA ($p= 0,03$) (Figura 5.13).

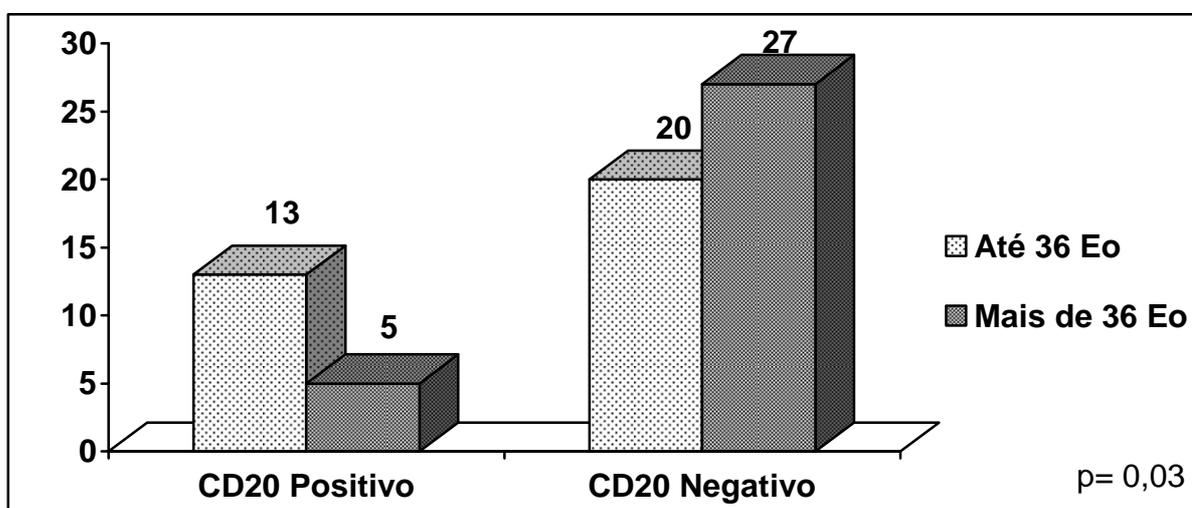


Figura 5.13: Relação entre a imunoexpressão do CD20 e o número de eosinófilos (Eo) em 10 CGA.

Desta vez, comparando-se com a intensidade do infiltrado eosinofílico, 12 (66,6%) dos 18 casos CD20 positivos apresentavam infiltrado leve, 5 (27,7%) moderado e 1 caso (5,7%) exibia infiltrado eosinofílico acentuado. Já nos 47 casos

CD20 negativos, 11 (23,4%) tinham infiltrado leve, 20 (42,5%) moderado e 16 pacientes (34,1%) apresentavam infiltrado acentuado ($p= 0,002$) (Tabela 5.16).

Tabela 5.16: Associação entre a imunoposição do CD20 e a intensidade do infiltrado eosinofílico.

INTENSIDADE do INFILTRADO Eo	CD 20		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
Leve	12	11	23
Moderado	5	20	25
Acentuado	1	16	17
TOTAL	18	47	65

* $p= 0,002$

O imunofenótipo CD20 esteve associado ainda com a leucometria. Embora restrito o número de casos em que esta associação pode ser avaliada ($n=26$), observou-se que os casos CD20 positivos estiveram mais frequentemente associados à leucopenia (62,5%), enquanto os casos CD20 negativos exibiam leucocitose predominantemente (83,3%) ($p= 0,02$). A tabela 5.17 mostra as características da associação.

Não foi encontrada associação entre a imunoposição do CD20 e outras características histológicas ou clínicas.

Tabela 5.17: Características histopatológicas e clínicas dos casos CD20 positivos.

VARIÁVEL	Nº DE CASOS	PERCENTUAL	PROBABILIDADE
Nº de Eosinófilos			
≤ 36	13	72,2%	
> 36	5	27,8%	
Total	18	100%	0,03
Intensidade Eo			
Leve	12	66,6%	
Moderada	5	27,7%	
Acentuada	1	5,7%	
Total	18	100%	0,002
Leucometria			
Diminuída	5	62,5%	
Aumentada	3	37,5%	
Total	8	100%	0,02

Nº: número. Eo: eosinófilos.

Com o intuito de averiguar a possibilidade de interação entre as variáveis estatisticamente associadas à expressão de CD20, foi realizada regressão logística multivariada. Como mostrada na tabela 5.18, houve perda de significação para todas as variáveis consideradas, sendo que a intensidade do infiltrado eosinofílico manteve uma tendência de associação.

Tabela 5.18: Regressão logística entre a imunexpressão do CD20 e o número de eosinófilos, a intensidade do infiltrado eosinofílico e a leucometria.

VARIÁVEL	B ⁺	SIGNIFICAÇÃO (p) ⁺⁺	OR	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
Número de Eosinófilos*	-0,183	0,86	0,83	0,1-6,9
Intensidade do Infiltrado Eosinofílico	2,91	0,06	18,32	0,82-407,21
Leucometria	0,47	0,53	1,61	0,36-7,14

* Número de eosinófilos em 10 CGA (≤ 36 versus > 36). ⁺ Resultado da regressão logística. ⁺⁺ Valor da significação da regressão logística.

5.7.2 Imunoexpressão do CD30 e CD15

Todas as associações do CD30 e do CD15 com as variáveis histológicas, clínicas e terapêuticas não foram significantes.

5.7.3 Imunoexpressão do BAX, p53 e Ki-67

Os casos considerados como BAX positivos estiveram correlacionados com os casos considerados como p53 positivos. Desta forma, dos 37 casos positivos para o BAX, 22 (59,4%) também eram positivos para o p53. A relação inversa foi encontrada, dos 17 casos negativos para o Bax, 14 o foram para o p53 (82,3%) ($p= 0,004$).

Os pacientes BAX positivos eram, com maior frequência, os que não apresentavam sintomas B. Assim, dos 34 casos BAX positivos, 25 não tinham sintomas constitucionais (73,5%); enquanto dos 16 casos BAX negativos, 10 (62,5%) apresentaram sintomas B ($p= 0,01$) (tabela.5.19)

Tabela 5.19: Características histopatológicas e clínicas dos casos BAX positivos.

VARIÁVEL	Nº DE CASOS	PERCENTUAL	SIGNIFICÂNCIA
BAX (casos)			
Positivos	22	59,4%	
Negativos	15	40,6%	
Total	37	100%	0,004
Sintomas			
A	25	73,5%	
B	9	26,5%	
Total	34	100%	0,01

A regressão logística multivariada foi realizada para determinar a interação entre as variáveis associadas à expressão de BAX e mostrou que os

casos BAX positivos, de fato, estão mais associados aos “sintomas A”, enquanto os casos BAX negativos são os que freqüentemente apresentam sintomas B ($p=0,04$). A expressão de p53 mostrou significação marginal ($p=0,059$).

Os casos p53 positivos apresentaram ainda um alto índice de proliferação celular ($Ki-67 \geq 51\%$ células H-RS). Dos 25 casos positivos para p53, 17 (68%) tinham alta expressão de Ki-67 ($p= 0,03$).

A regressão logística entre a imunexpressão do p53 (casos positivos x casos negativos) e o índice de proliferação celular mostrou tendência de associação ($p=0,09$). Desta forma, os casos considerados como p53 positivos parecem exibir maior índice de proliferação celular ($Ki-67 \geq 51\%$)

O índice de proliferação celular correlacionou-se inversamente com o estadiamento. Ou seja, estadios menores tiveram maior número de células H-RS positivas para o Ki-67, enquanto estadios maiores tiveram menor índice ($p= 0,01$). Isto foi confirmado na regressão logística multivariada. Porém, ao se agrupar os estadiamentos em grupos de risco, houve a perda da significância ($p=0,8$).

5.8 Características Histológicas, Clínicas e Moleculares Encontradas nos Casos de Linfoma de Hodgkin Associados ao Vírus Epstein-Barr

A associação do linfoma de Hodgkin com o EBV foi determinada por imunohistoquímica, hibridização *in situ* e PCR para o gene EBNA2, conforme descrito na metodologia.

A hibridização *in situ* para os transcritos EBERs foi positiva em 24 casos (37%); 41 pacientes (63%) não apresentaram nenhum tipo de sinal. Os casos positivos apresentaram, predominantemente, marcação em mais de 75% das células

neoplásicas (tabela 5.20). Caracteristicamente, os casos positivos apresentaram marcação nuclear (Figuras 5.14 e 5.15).

O estudo imunohistoquímico para LMP1 mostrou a expressão desta proteína em 31 pacientes (47,7%). A maioria dos casos que expressaram LMP-1 exibiu a imunoexpressão em mais de 75% das células H-RS, como mostrado na tabela 5.20. O padrão de marcação encontrado foi o citoplasmático com raros casos expressando também o sinal paranuclear (Figuras 5.15 e 5.16).

Tabela 5.20: Distribuição percentual das células neoplásicas expressando os transcritos EBERs e a proteína LMP1.

CÉLULAS POSITIVAS	EBERs-ISH	LMP1 – IHQ
	Nº DE CASOS (%)	Nº DE CASOS (%)
≤ 10%	0 (0)	3 (9,7)
11 a 25%	1 (4,2)	0 (0)
26 a 50%	2 (8,3)	6 (19,4)
51 a 75%	2 (8,3)	1 (3,2)
> 75%	19 (79,2)	21 (67,7)
TOTAL	24 (100)	31 (100)

ISH: hibridização in situ; IHQ, imunohistoquímica

Sete casos tiveram resultados discordantes entre a imunohistoquímica para LMP1 e o ISH para os transcritos EBERs. Todos os casos discordantes foram positivos para LMP1 e negativos para o ISH. As determinações foram repetidas em outro Centro (Laboratório de Virologia, Hospital “Ricardo Gutierrez”, Argentina), com os mesmos resultados. Dos 7 casos, 6 pertenciam ao subtipo EN.

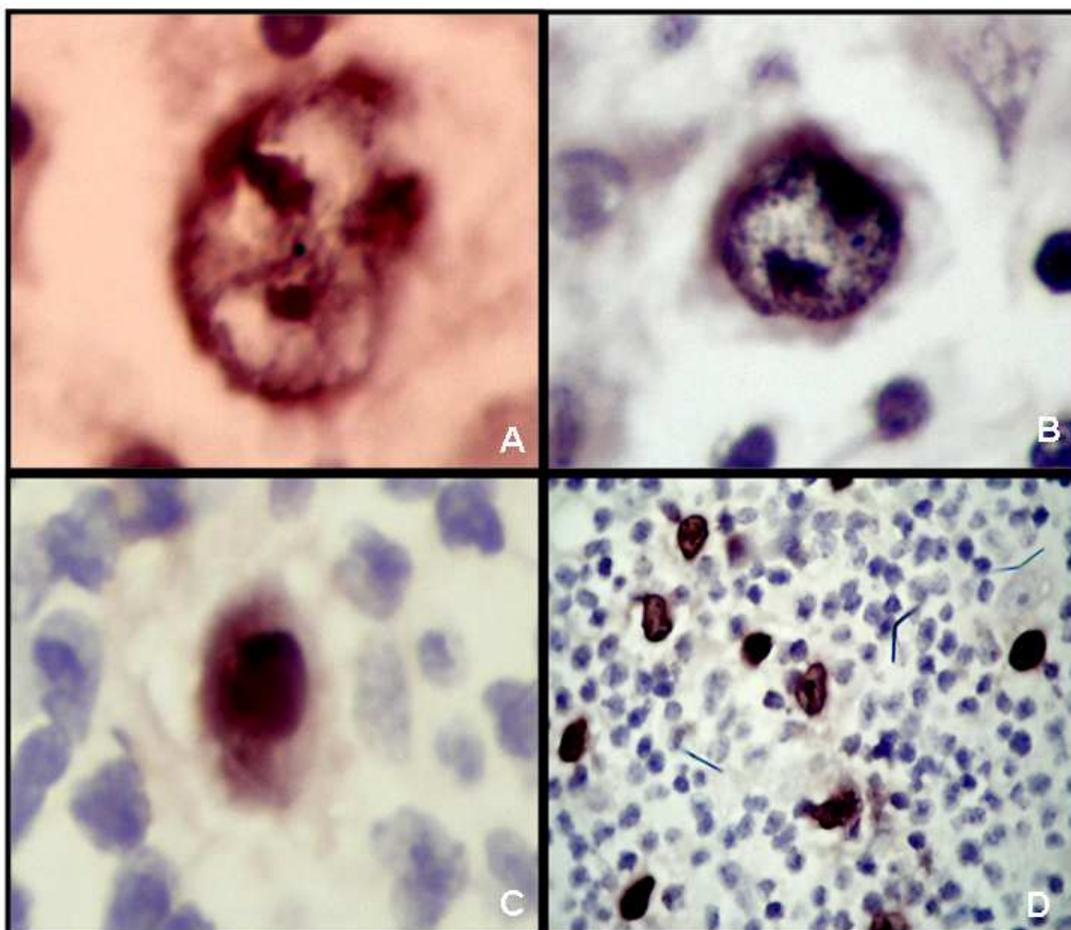


Figura 5.14: Exemplos de casos positivos para os EBERs. A) Célula de Reed-Sternberg positiva para os transcritos EBERs (caso 18). 1000x. B) Célula de Hodgkin mostrando marcação nuclear para os EBERs (caso 1). 1000x. C) Célula de Hodgkin positiva para os EBERs (caso 23). 1000x. D) Células de Hodgkin positivas para os EBERs (caso 23). 400x.

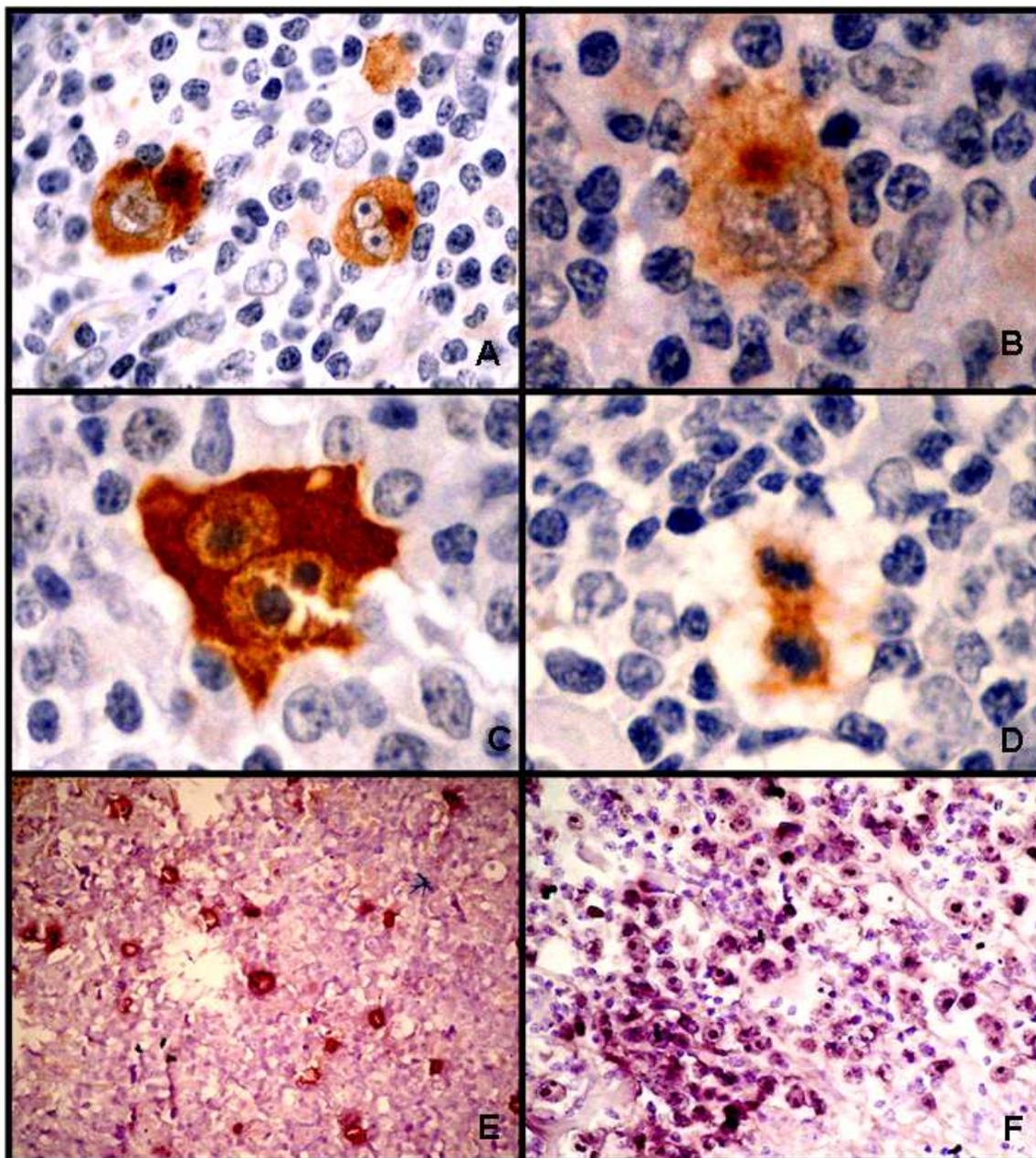


Figura 5.15: Exemplos de casos positivos para LMP1 e EBERs. A) Célula de Hodgkin e Reed-Sternberg com marcação citoplasmática e paranuclear para LMP1 (caso 54). 1000x. B) Detalhe de uma célula de Hodgkin com marcação citoplasmática e paranuclear para LMP1 (caso 21). 1000x. C) Detalhe de uma célula de Reed-Sternberg com marcação citoplasmática para LMP1 (caso 18). 1000x. D) Detalhe de uma célula neoplásica positiva para LMP1 em mitose (caso 17). 1000x. E) Células de Hodgkin mostrando marcação nuclear para o EBER1 (caso 47). 400x. F) Campo com grande número de células neoplásicas positivas para o EBER1 (caso 24). 400x.

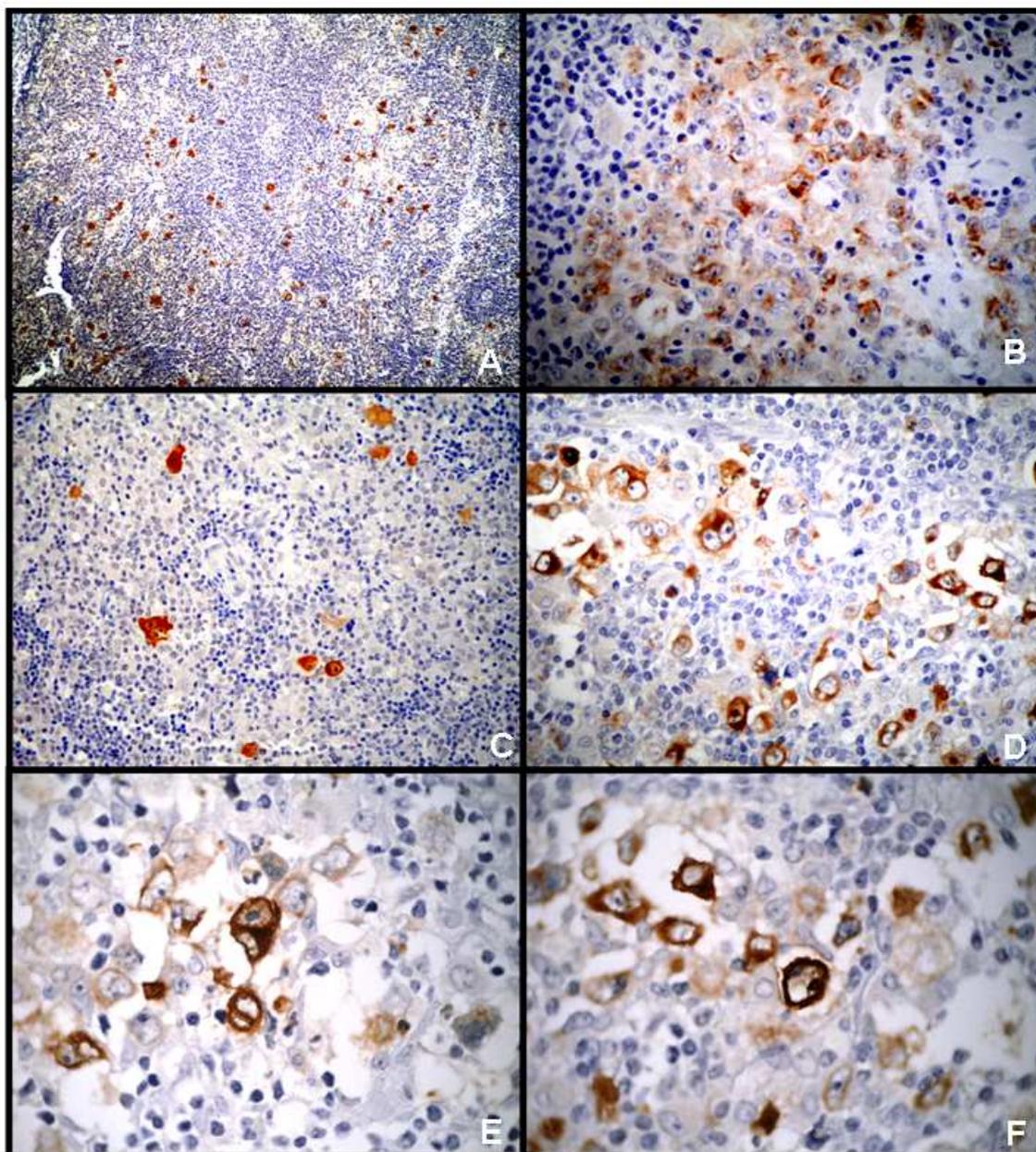


Figura 5.16: Exemplos de casos imunopositivos para LMP1. A) Caso com grande número de células de Hodgkin e Reed-Sternberg positivas para LMP1 (caso 33) . 40x. B) Campo com grande número de células H-RS positivas para LMP1 (caso 24). 400x. C) Células H-RS com intensa marcação citoplasmática para LMP1 (caso 18). 40x. D) Campo com grande número de células de H-RS expressando LMP1 (caso 47). 400x. E) Célula de Hodgkin e Reed-Sternberg positivas para LMP1 (caso 47). 1000x. F) Célula de Hodgkin mostrando marcação citoplasmática para LMP1 (caso 47). 1000x.

Em relação à caracterização molecular do EBV, dos 31 casos que mostraram a presença do vírus por ISH ou IHQ, em 27 (87%) foi possível obter DNA amplificável, como demonstrado pela amplificação dos genes constitutivos GAPDH, b-globina e b-actina. Adicionalmente, foram avaliados 10 casos EBV-negativos, com o intuito de confirmar a especificidade dos métodos moleculares.

A amplificação diferencial do gene EBNA2, que permitiu tipificar os isolados virais, mostrou que o EBV de tipo 1 (EBV1) foi o mais freqüente, com 23 dos 27 linfomas EBV positivos (85%) apresentando este tipo viral, enquanto que 4 casos apresentaram o EBV2 (15%).

Dos 11 controles não neoplásicos (CNN), 9 foram EBV1 (82%), um caso foi EBV2 (9%) e um caso mostrou co-infecção por ambas as cepas virais (9%). Coincidentemente, este último caso estava associado ao HIV e apresentava infecção pelo vírus da Hepatite C e o Herpesvírus humano de tipo 8 (dados não mostrados).

Quando comparadas as neoplasias e os CNN, não foi observada associação estatisticamente significativa entre condição patológica e tipo viral (Teste exato de Fisher, $P=0,86$). Os tipos virais não estiveram associados ao subtipo histológico nem foram diferencialmente encontrados nos casos LMP1+/EBERs negativos (5/7 casos analisáveis).

Nos 27 casos com linfoma EBV+ e DNA amplificável, assim como nos 11 CNN EBV+, foi investigada por PCR a presença de uma deleção de 30 pb (del30pb) no terceiro exon do gene LMP1, correspondente à região C-ter da proteína LMP1 e situada entre as posições nucleotídicas 168294 e 168265. Em 20/27 casos de LH (74%) e 3/11 CNN (27%), os resultados de PCR indicaram a presença da del30pb e em 7/27 linfomas (26%) e 7/11 (64%) CNN foi detectada a presença do alelo

selvagem (wt) (Figura 5.17). Uma hiperplasia reativa mostrou a presença de ambos alelos del30pb/wt. Este caso encontrava-se associado ao vírus HIV. A del30 mostrou associação significativa com o linfoma de Hodgkin ($p=0,023$, Test Exato de Fisher).

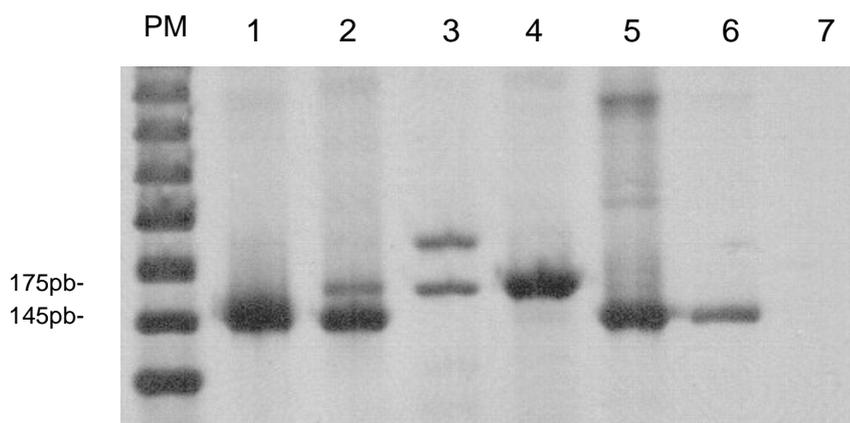


Figura 5.17: Amplificação da deleção de 30 pb na região C-ter do gene LMP1. PCR nested, alelo selvagem (wt) 175 pb e alelo deletado (del30pb) 145 pb. Casos com linfoma de Hodgkin e hiperplasias reativas; 1: del30pb; 2: co-existência wt/del30pb; 3: wt/alelo duplicado?; 4: wt; 5 e 6: del30pb; 7: Controle de PCR. PM: Marcador de peso molecular 50 pb. Gel de poliácridamida 12%, coloração por prata.

O EBV mostrou tendência de associação com o subtipo histológico. Dos 8 casos de CM, 7 (87,5%) foram positivos para o vírus ($p=0,057$). Os pacientes com EN também apresentaram prevalência expressiva para o EBV já que 23 casos (46%) mostraram a presença do EBV nas células tumorais (Tabela 5.21).

Não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência do EBV em relação aos grupos etários, embora os pacientes com até 10 anos fossem mais frequentemente associados com o vírus (62,5%), ao contrário do grupo de maior idade (42,8%) ($p=0,1$).

O EBV não esteve associado ao imunofenótipo do linfoma de Hodgkin, subtipo da EN, número de células H-RS, número de mitoses, padrão interfolicular, necrose, p53, Bax, Ki-67, estadiamento, grupo de risco nem características clínicas.

Tabela 5.21: Associação entre o vírus Epstein-Barr e os subtipos histológicos.

EBV	SUBTIPO HISTOLÓGICO			TOTAL
	EN	CM	DL	
Presente	23	7	1	31
Ausente	30	1	2	33
TOTAL	53	8	3	64

EN: Esclerose nodular. CM: Celularidade mista. DL: Depleção linfocitária. Nota: Um caso não teve classificação do subtipo histológico pois o diagnóstico foi realizado em biópsia de medula óssea.

* $p= 0,057$

5.9 Caracterização Histológicas e Clínica dos Grupos Etários ≤ 10 anos e > 10 anos no Linfoma de Hodgkin

Durante as análises dos resultados foram observadas diferenças clínico-patológicas entre os grupos etários ≤ 10 anos e > 10 anos. Para validar a significação clínica destas observações, foi realizada uma análise pormenorizada dividindo os pacientes nestes referidos grupos. A tabela 5.22 apresenta um resumo das variáveis associadas preferencialmente a estes grupos etários.

O subtipo CM esteve associado ao grupo de crianças de menor idade. Dos 8 casos deste subtipo, 7 (87,5%) tinham menos de 10 anos ($p= 0,0002$).

A idade também se correlacionou com o grau da EN. A maioria dos casos com até 10 anos (88,8%) exibiam esclerose grau I, enquanto as crianças mais velhas tinham mais frequentemente esclerose grau II (60%) ($p= 0,01$, Teste exato de Fisher). O mesmo padrão foi observado em relação ao número de células H-RS em 10 CGA, onde as crianças mais jovens (≤ 10 anos) tinham menos células neoplásicas em 10 CGA (87,5% dos casos), enquanto 59% das crianças mais velhas tinham um maior *pool* de células neoplásicas ($p= 0,001$).

Tabela 5.22: Características clínicas e histológicas por grupos de idade.

VARIÁVEL	GRUPOS ETÁRIOS		PROBABILIDADE*
	≤ 10 anos	> 10 anos	
Subtipo Histológico			
EN	9	44	
CM	7	1	
DL	0	3	0,0002
Grau da esclerose nodular			
I	8	18	
II	1	26	0,01
Nº de células H-RS**			
≤ 40	14	20	
> 40	2	29	0,001
Estadiamento			
I	5	2	
II	3	23	
III	3	16	
IV	2	7	0,006
Grupo de Risco			
Favorável	10	21	
Desfavorável	3	27	0,03
Massa Mediastinal			
Sim	4	37	
Não	9	10	0,001

* Teste Exato de Fisher. **Nº de células H-RS em 10 CGA. EN: Esclerose nodular. CM: Celularidade mista. DL: Depleção linfocitária.

Houve também associação da idade com variáveis clínicas. Em relação ao estadiamento, 61,5% das crianças mais novas tiveram estadios menores (I ou II), enquanto 48% das crianças mais velhas apresentaram estadios maiores (III ou IV) ($p= 0,006$). Esta associação foi mantida ao se agrupar os estadiamentos em grupos de risco. Setenta e sete por cento dos pacientes com até 10 anos estavam no grupo de doença favorável, enquanto 56,2% das crianças mais velhas eram do grupo desfavorável ($p= 0,03$).

A massa mediastinal mostrou diferença entre os dois grupos etários, sendo mais prevalente nas crianças maiores de 10 anos (78,7%). Apenas 30,7% das crianças com até 10 anos exibiam o alargamento de mediastino ($p= 0,001$).

Não foi encontrada associação entre os grupos etários e número de mitose, imunofenótipo, subtipo da esclerose nodular, número de mitoses, padrão interfolicular, necrose, CD15, CD30, p53, Bax, Ki-67, outras características clínicas, sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Entretanto, a regressão logística entre o grupo etário e as variáveis descritas anteriormente mostrou apenas tendência de associação em relação ao estadiamento ($p=0,07$).

5.10 Correlações Entre as Características Clínicas e Laboratoriais

A presença de massa mediastinal, avaliável em 60 casos, exibiu associações significativas com tipo de sintoma, grupo de risco da doença, leucometria e níveis de hemoglobina (Tabela 5.23). A presença de sintomas “B” foi observada em 51,2% dos pacientes com massa mediastinal, sendo que 87,5% dos casos com sintomas “B” apresentavam o alargamento.

Os pacientes com massa mediastinal foram os mais frequentemente alocados no grupo de risco desfavorável (61%). Os casos sem o referido achado, eram na maioria do grupo de doença favorável (79%) ($p= 0,004$).

O alargamento de mediastino também esteve associado a alterações laboratoriais. Os pacientes com massa mediastinal foram mais frequentemente associados à leucocitose (85%), enquanto aqueles que não tinham este achado exibiram mais leucopenia (83,3%) ($p= 0,001$). O mesmo aconteceu com o nível de

hemoglobina; os pacientes com massa mediastinal tiveram mais anemia (78.7%) ($p=0,004$).

Tabela 5.23: Associação entre a presença da massa mediastinal e as variáveis clínico-laboratoriais.

VARIÁVEL	MASSA MEDIASTINAL		PROBABILIDADE*
	SIM	NÃO	
Sintomas			
A	20	16	
B	21	3	0,009
Grupo de Risco			
Favorável	16	15	
Desfavorável	25	4	0,004
Leucometria			
Leucopenia	3	5	
Leucocitose	17	1	0,001
Nível de Hemoglobina			
Normal	7	8	
Diminuído	26	8	0,004

* Teste Exato de Fisher ou X^2 com correção de Yates.

Foi realizada a regressão logística incluindo massa mediastinal como variável dependente, e as variáveis que isoladamente mostraram associação estatística. Apenas a leucometria permaneceu significativa, confirmando que os casos com massa mediastinal são os mais propensos à leucocitose (Tabela 5.24).

Tabela 5.24: Regressão logística da massa mediastinal com sintomas, grupo de risco, leucometria e nível de hemoglobina.

VARIÁVEL	B ⁺	SIGNIFICAÇÃO (p) ⁺⁺	OR	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
Sintomas	-0,50	0,676	0,61	0,05-6,33
Grupo de Risco	-0,975	0,378	0,38	0,04-3,30
Leucometria	-20,94	<0,0001	8x10 ⁻¹⁰	1,1x10 ⁻¹⁰ - 5,8x10 ⁻⁹
Nível de Hemoglobina	-0,342	0,675	0,71	0,14-3,50

⁺ Resultado da regressão logística. ⁺⁺ Valor da significação da regressão logística.

A leucometria esteve também associada a variáveis clínico-laboratoriais (Tabela 5.25). Uma maior intensidade do infiltrado eosinofílico tumoral foi observada nos casos com leucometria normal (70%) ou aumentada (66,6%) (p= 0,01).

Os pacientes com leucometria normal ou diminuída apresentaram mais frequentemente sintomas “A” (77,4% dos pacientes com sintomas “A”), enquanto aqueles com leucocitose estiveram associados a sintomas “B” (50% dos pacientes com sintomas “B”). Ao se levar em consideração apenas os casos com alteração da contagem leucocitária, o aumento dos leucócitos continuou associado à presença de sintomas “B”. Dos 18 casos com leucocitose, 61% tinham sintomas “B” (p= 0,02).

Aumento ou diminuição na contagem de leucócitos foram observados preferencialmente nos casos com mais de 120 dias de intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico (p= 0,0002). Dos 26 casos com este tipo de alteração, 18 (69%) tinham mais de 120 dias. Já dos 27 casos com leucometria normal, apenas 4 (14,8%) tinham intervalo superior a 120 dias.

Tabela 5.25: Associação entre a contagem leucocitária e as variáveis clínico-laboratoriais.

VARIÁVEL	LEUCOMETRIA			PROBABILIDADE*
	Normal	Diminuída	Aumentada	
Infiltrado Eosinofílico				
Leve	8	7	6	
Moderado	8	0	9	
Acentuado	10	1	3	0,01
Sintomas				
A	17	7	7	
B	10	1	11	0,053
Intervalo Diagnóstico				
≤ 120 dias	23	2	6	
> 120 dias	4	6	12	0,0002

* χ^2 com correção de Yates.

A regressão logística confirmou a associação da leucometria com os sintomas e a intensidade de infiltração por eosinófilos. A relação entre o número de leucócitos e o intervalo diagnóstico mostrou associação estatística; os casos com leucometria normal tiveram menor intervalo; já os casos com leucocitose tiveram predominantemente intervalo diagnóstico superior a 120 dias (tabela 5.26).

Tabela 5.26: Regressão logística da leucometria com a intensidade do infiltrado eosinofílico, tipo de sintomas e intervalo diagnóstico.

VARIÁVEL	B ⁺	SIGNIFICAÇÃO (p) ⁺⁺	OR	INTERVALO DE CONFIANÇA 95%
Intensidade Infiltrado Eo	-2,66	0,021	0,07	0,07-0,67
Sintomas	1,96	0,024	7,11	1,3-38,86
Intervalo Diagnóstico	-2,39	0,007	0,09	0,01- 0,51

⁺ Resultado da regressão logística. ⁺⁺ Valor da significação da regressão logística.

Foi procedida ainda a análise univariada para determinar se o tempo de evolução da doença (≤ 120 dias x > 120 dias) estaria relacionado ao grupo de risco, que mostrou uma falta de associação estatística entre as duas variáveis ($p=0.5$).

5.11 Tratamento, Seguimento e Fatores Prognósticos

Os dados completos referentes ao tratamento foram obtidos em 60 dos 65 pacientes registrados neste estudo.

Todas as crianças receberam poliquimioterapia antineoplásica, conforme exibido na tabela 5.27, sendo o esquema ABVD (adriplastina, bleomicina, vincristina e DTIC) o mais utilizado (36 casos, 60%).

Vinte crianças (33,3%) receberam o esquema quimioterápico proposto pelo grupo alemão-austríaco (*German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Study Group – GAHSG*), denominado HD90 (Schellong et al, 1999). Neste protocolo, os meninos receberam o etoposide ao invés da procarbazina que era de exclusividade das meninas; o restante das drogas (vincristina, prednisona e adriplastina) foi igual para ambos. Os pacientes com doença avançada receberam ainda COPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona). Todos os casos receberam radioterapia em campo envolvido (tabela 5.28).

Tabela 5.27: Esquema quimioterápico recebido pelos 60 pacientes analisados.

PROTOCOLO	CASOS
ABVD	36 (60%)
HD90	20 (33,3%)
AVE	1 (1,7%)
CMOPP	1 (1,7%)
MOPP ABV	1 (1,7%)
CMOP ABVD	1 (1,7%)

ABVD: Adriblastina, Bleomicina, Vincristina, DTIC. AVE: Adriblastina, Vincristina, Etoposide. CMOPP: Ciclofosfamida, Mostarda Nitrogenada, Vincristina, Procarbazina, Prednisona. MOPP ABV: Mostarda Nitrogenada, Vincristina, Procarbazina, Prednisona, Adriblastina, Bleomicina, Vincristina. CMOP ABVD: Ciclofosfamida, Mostarda Nitrogenada, Vincristina, Prednisona, Adriblastina, Bleomicina, Vincristina, DTIC. HD90: Protocolo germano-austriaco.

A radioterapia foi adicionada ao tratamento quimioterápico em 39 pacientes (65%). Os campos variaram de acordo com a localização da cadeia linfonodal e/ou órgão comprometidos, sendo o manto o mais utilizado (22 casos, 56,4%).

Tabela 5.28: Distribuição dos casos submetidos à radioterapia quanto ao campo utilizado.

CAMPO	CASOS
Manto	22 (56,4%)
Cervical	9 (23,1%)
Pélvis	1 (2,6%)
Mediastino e Cervical	4 (10,6%)
Fossa Supraclavicular	1 (2,6%)
Cervical e Fossa Supraclavicular	1 (2,6%)
Cervical, Mediastino e Abdomen	1 (2,6%)

A tabela seguinte mostra a estratégia terapêutica dos pacientes incluídos neste estudo.

Tabela 5.29: Estratégia terapêutica (quimioterapia e/ou radioterapia) dos 60 pacientes analisados.

QUIMIOTERAPIA	RADIOTERAPIA		TOTAL
	Sim	Não	
Sim	39	21	60
TOTAL	39 (65%)	21 (35%)	60 (100%)

Para análise da resposta terapêutica, os casos foram divididos em 3 grupos:

- Grupo 1: pacientes que terminaram o tratamento antineoplásico inicial e não recaíram;
- Grupo 2: pacientes que terminaram o tratamento antineoplásico inicial e recaíram;
- Grupo 3: pacientes que tiveram progressão de doença durante o tratamento inicial.

Do total de 60 pacientes analisados quanto ao tratamento, 49 casos foram do grupo 1 (81,6%), 7 do grupo 2 (11,6%) e 4 do grupo 3 (6,8%).

No grupo 1, quarenta e cinco pacientes estão vivos e sem doença, 1 morreu por outras causas não relacionadas ao câncer e em 3 houve perda de seguimento. Do grupo que recaiu, 5 casos terminaram o tratamento de resgate e estão vivos sem doença, 1 paciente continua em tratamento, porém sem evidências de doença e 1 criança morreu por toxicidade terapêutica. No grupo 3, dois pacientes terminaram o tratamento de resgate e estão vivos sem doença e 2 morreram por progressão de doença (Tabela 5.30).

Juntando-se todos os 60 casos, a análise do status de seguimento mostrou 53 casos vivos (88,3%), 4 óbitos (6,7%) e 3 perdas de seguimento (5%) (Figura 5.17).

Tabela 5.30: Status de seguimento dos 60 casos divididos nos 3 grupos de análise.

STATUS	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Vivo pós-tratamento	45 (91,8%)	5 (71,4%)	2 (50%)
Vivo em tratamento	-	1 (14,3%)	-
Perda de seguimento	3 (6,1%)	-	-
Óbito por progressão de doença	-	-	2 (50%)
Óbito por toxicidade	-	1 (14,3%)	-
Óbito por outras causas	1 (2,1%)	-	-
TOTAL	49 (100%)	7 (100%)	4 (100%)

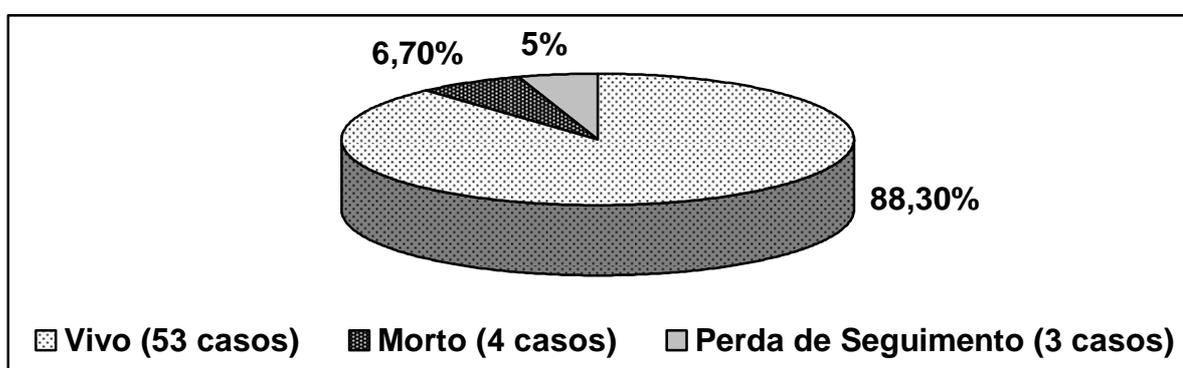


Figura 5.18. Status de seguimento dos 60 casos analisáveis. Observações: Dos pacientes vivos, 52 casos fora de terapia e 1 caso em tratamento. Causas dos óbitos: 2 casos por progressão de doença, 1 caso por toxicidade, 1 não relacionado ao câncer

Para análise das sobrevidas, conforme descrito na metodologia, todos os pacientes foram considerados como pertencentes ao mesmo protocolo terapêutico uma vez que não houve diferença na SLD e na SG entre os regimes terapêuticos empregados (respectivamente, $p=0,4$ e $p=0,9$).

A sobrevida global (SG) foi de 94,7% e variou de 2 a 89 meses (mediana de 44 meses). Já a sobrevida livre de doença (SLD) foi de 87,5%, variando de 0 a 69 meses (mediana de 31 meses) (Figura 5.19).

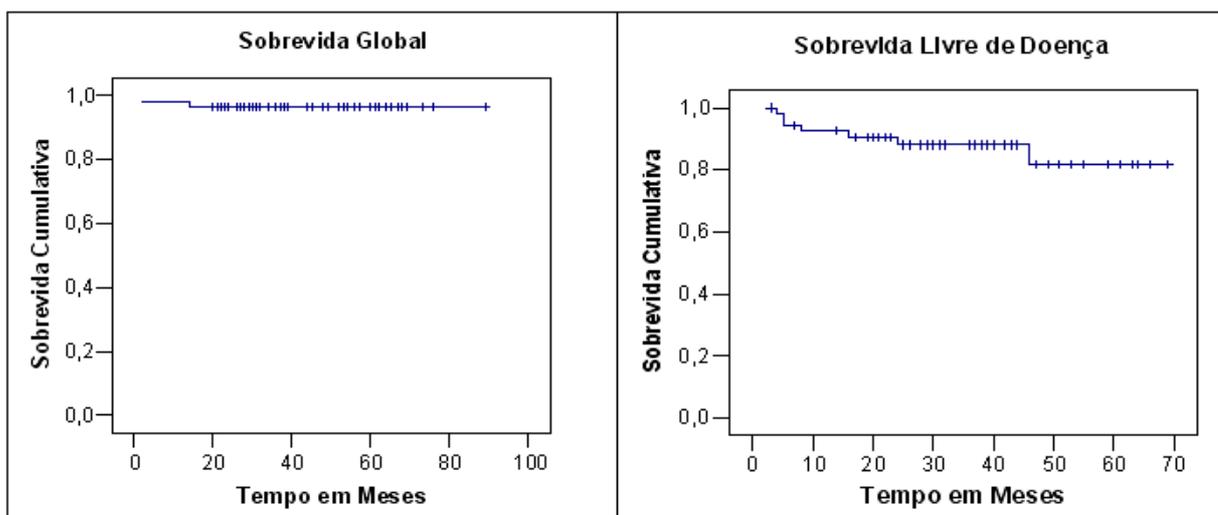


Figura 5.19: Sobrevida global e sobrevida livre de doença dos 57 casos com seguimento completo.

A análise da recaída em relação ao estadiamento mostrou que, dos 7 pacientes afetados por este evento, 2 (28,6%) eram do estadio II, 2 (28,6%) do estadio III e 3 (42,8%) do estadio IV. Ao se agrupar estes casos nos grupos favorável e desfavorável, observou-se uma distribuição semelhante: 3 (43%) pacientes no grupo favorável e 4 (57%) no grupo desfavorável (Tabela 5.31).

A progressão de doença ocorreu em 1 caso do estadio II (25%), 2 casos do estadio III (50%) e 1 caso do estadio IV (25%). Ao se correlacionar este evento com o grupo de risco, 75% dos pacientes eram do grupo desfavorável (3 casos) e 1 (25%) do grupo favorável. Todos os 4 pacientes que foram ao óbito eram do grupo de doença desfavorável ($p= 0,04$) (2 casos ao estadio IIB e 2 ao estadio IV). Três pacientes tiveram perda de seguimento.

Tabela 5.31: Distribuição por estadiamento e grupos de risco dos casos que recaíram.

ESTRATIFICAÇÃO	RECAÍDA		TOTAL
	SIM	NÃO	
Estadiamento			
I	-	6	6
II	2	23	25
III	2	15	17
IV	3	5	8
Total	7	49	56
			(p= 0,1)
Grupo			
Favorável	3	26	29
Desfavorável	4	23	27
Total	7	49	56
			(p= 0,2)

A SG no grupo com doença favorável tendeu a ser superior do que a observada no grupo com doença desfavorável (p= 0,08). Não houve diferença estatística na SLD entre os grupos de doença favorável e desfavorável (Figura 5.20).

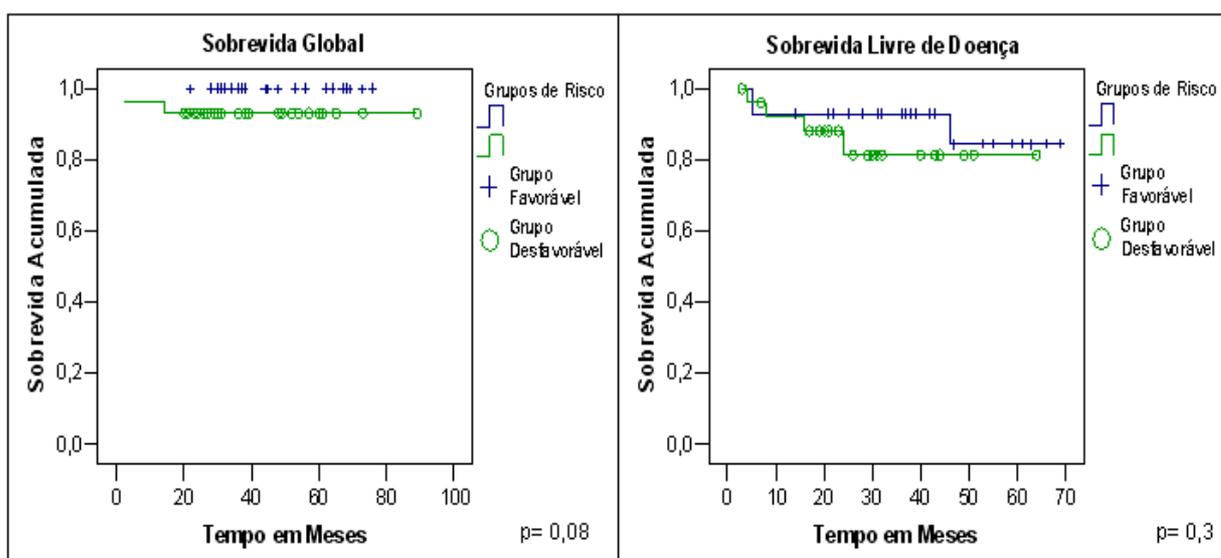


Figura 5.20: Sobrevida global e sobrevida livre de doença estratificando-se os pacientes por grupo de risco.

O número de sítios acometidos esteve relacionado com o prognóstico. Os pacientes com mais de 5 sítios topográficos acometidos pelo linfoma de Hodgkin tiveram uma pior SLD ($p= 0,03$) (Figura 5.21). Do total de pacientes, 85% com mais de 5 sítios acometidos eram dos estadios III/IV ($p= 0,01$) (Tabela 5.32).

Tabela 5.32: Frequência de casos quanto ao número de sítios acometidos (≤ 5 versus > 5) e o estadiamento.

SÍTIOS	ESTADIAMENTO				TOTAL
	I	II	III	IV	
≤ 5	6	27	14	6	53
> 5	0	0	5	3	8
TOTAL	6	27	19	9	61

* $p= 0,01$

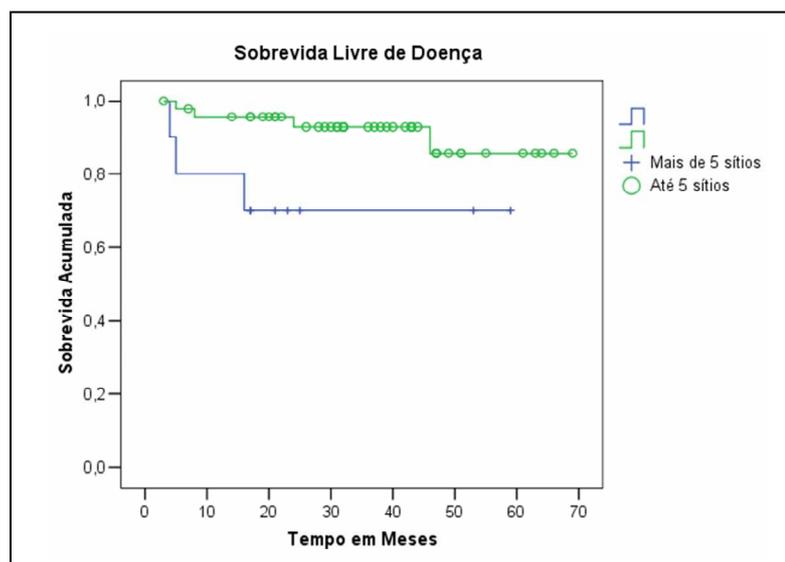


Figura 5.21: Sobrevida livre de doença de todos os casos, estratificando-os pelo número de sítios topográficos acometidos. $p=0,03$.

A distribuição por grupo de risco da doença não mostrou significação estatística. A SLD de acordo com o número de sítios acometidos (mais de 5 versus menos de 5), dividindo os pacientes pelo grupo de risco da doença mostrou tendência de significância estatística apenas para o grupo desfavorável ($p= 0,061$) (figura 5.22).

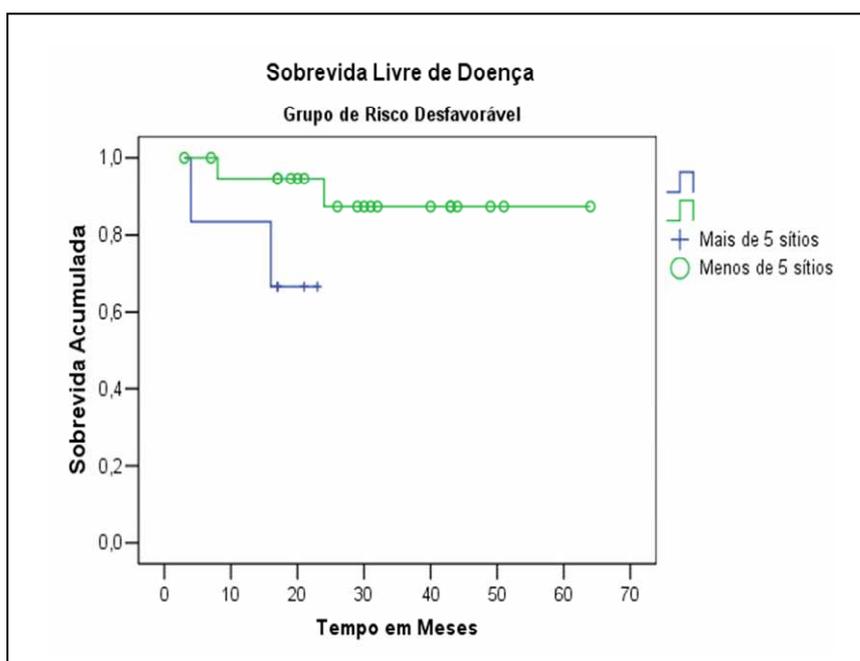


Figura 5.22: Sobrevida livre de doença no grupo e pacientes com doença desfavorável, estratificando-os pelo número de sítios topográficos acometidos. $p=0,061$.

O grau da EN também mostrou diferenças na SLD. Os casos de EN GII apresentaram SLD de 100%, enquanto os casos GI exibiram uma SLD de apenas 50% ($p= 0,002$). A fim de se avaliar a veracidade destes achados, foi procedida a estratificação por grupo de risco (favorável / desfavorável). Ao se agrupar todos os casos favoráveis, houve uma tendência de melhor SLD para os casos GII em relação aos casos GI ($p= 0,06$). Já no grupo dos casos desfavoráveis, esta diferença foi estatisticamente significativa ($p= 0,002$) (figuras 5.23 e 5.24). Quando se avaliou a

relação entre o grau da EN e a recaída, observou-se que os pacientes com EN GII nenhum recaiu (0/24 pacientes), ao contrário das crianças com EN GI (7/23) ($p=0,003$).

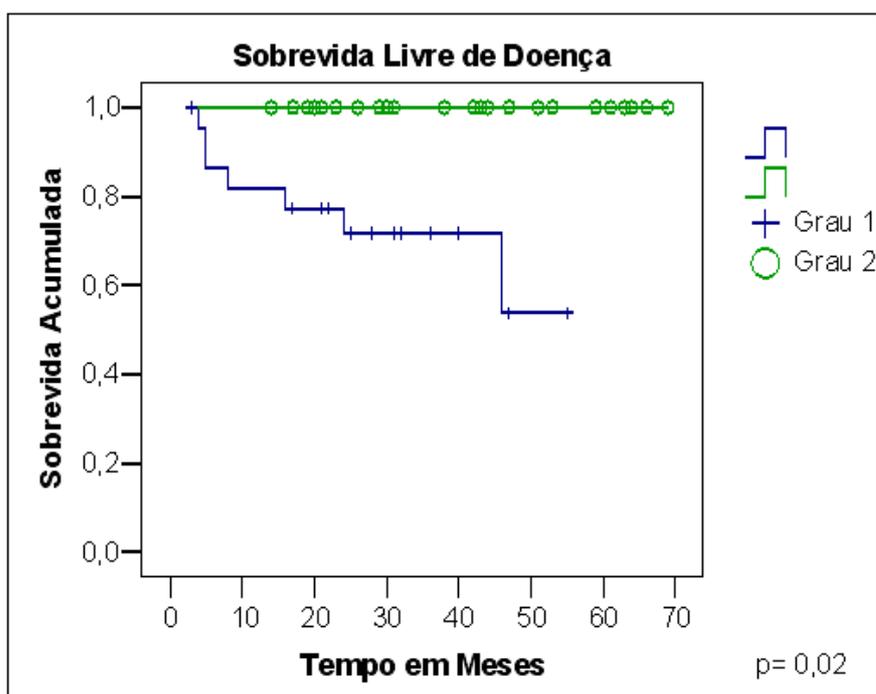


Figura 5.23: Sobrevida livre de doença dos casos de esclerose nodular estratificando-se os pacientes quanto ao grau da esclerose nodular.

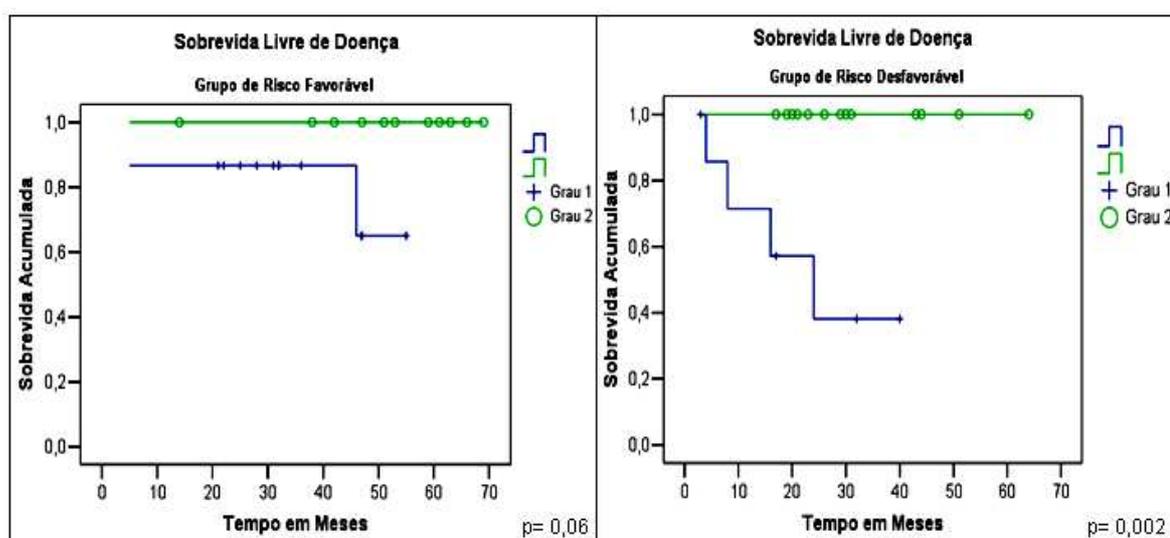


Figura 5.24: Sobrevida livre de doença dos casos de esclerose nodular por grupos de risco, estratificando-os quanto ao grau da esclerose nodular.

O número de células H-RS (≤ 40 versus > 40) também mostrou diferenças na SLD quando os pacientes foram estratificados por grupo de risco. No grupo desfavorável, a SLD foi pior para os casos com menos de 40 células H-RS por 10 CGA (30% de SLD) em relação aos pacientes com mais células (95% de SLD) ($p= 0,004$). O grupo de doença favorável não teve significação estatística ($p= 0,3$) (Figura 5.25).

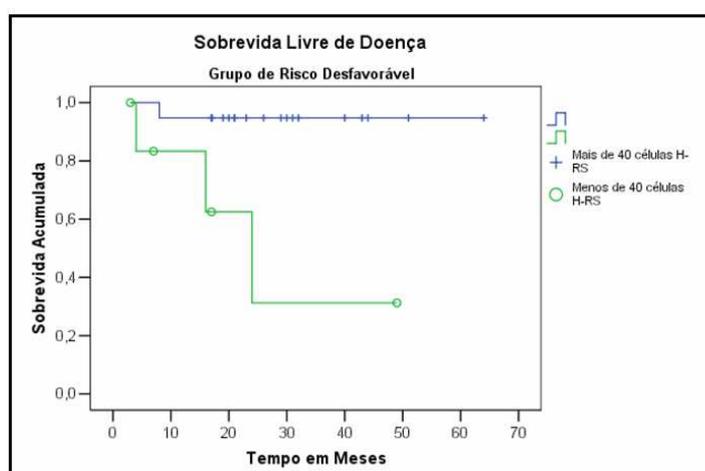


Figura 5.25: Sobrevida livre de doença, estratificando-se os pacientes pelo número de células H-RS em 10 CGA. $p= 0,004$.

O Ki-67, além das associações já descritas, mostrou associação com a sobrevida livre de doença. Os casos do grupo de risco desfavorável com alto índice de proliferação celular apresentaram melhor SLD (100%) do que aqueles com baixo índice (60%) ($p= 0,05$). Já no grupo de risco favorável, não se obteve significação estatística (Figura 5.26).

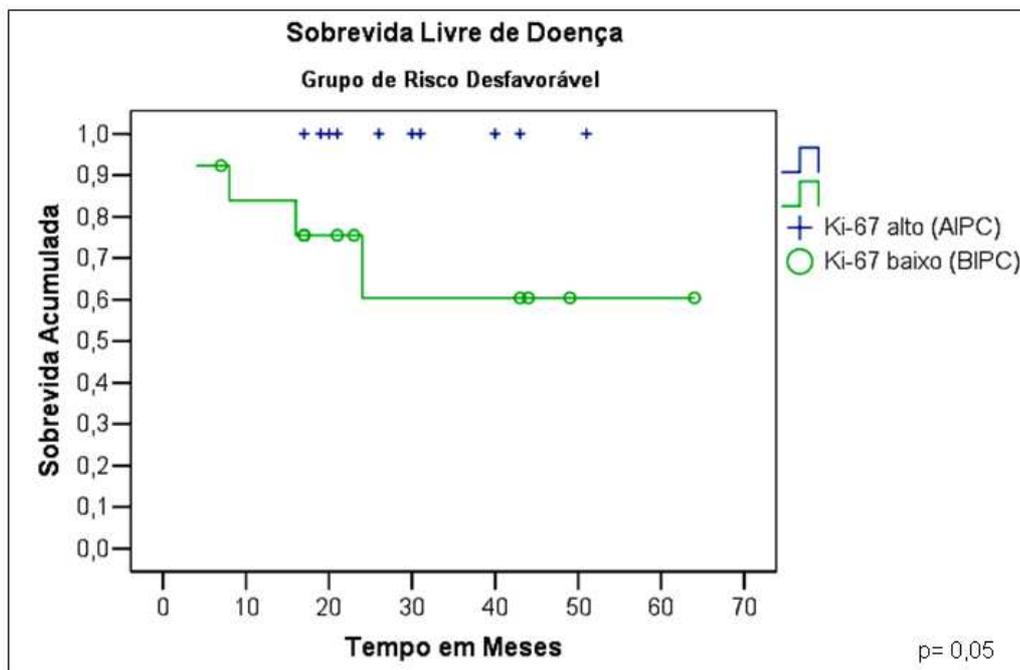


Figura 5.26: Sobrevida livre de doença do grupo de risco desfavorável, estratificando-se os pacientes quanto ao índice de proliferação celular (Ki-67 positivo em pelo menos 51% de células H-RS). AIPC: Alto índice de proliferação celular. BIPC: Baixo índice de proliferação celular.

Como exposto anteriormente, o número de células neoplásicas, o grau da EN e o alto índice de proliferação celular e o número sítios topográficos estiveram, cada um, estatisticamente associados à SLD. A fim de confirmar se estas variáveis poderiam atuar como preditores independentes da SLD no grupo de sobrevida livre de doença foi procedida à regressão de Cox. O número de sítios acometidos pelo linfoma de Hodgkin esteve verdadeiramente associado à SLD, enquanto o número de células H-RS mostrou tendência de significância (Tabela 5.33).

Tabela 5.33: Regressão de Cox das variáveis relacionadas à sobrevida livre de doença na análise univariada.

VARIÁVEL	SIGNIFICÂNCIA (p)	INTERVALO DE CONFIANÇA	
		Inferior	Superior
Nº de Sítios	0,03	0,007	0,8
Nº de Células H-RS	0,08	0,02	1,2
Grau da EN	0,9	0,0005	1E+123
Índice de PC	0,5	0,2	18,3

Nº: Número. H-RS: células de Hodgkin e Reed-Sternberg. EN: Esclerose nodular. PC: Proliferação celular.

Em relação ao EBV, a sobrevida livre de doença não foi diferente nos pacientes associados ou não ao vírus. Entretanto, no grupo de doença favorável foi observada uma melhor SLD nos casos EBV negativos. O oposto foi encontrado no grupo de doença desfavorável; uma melhor SLD foi observada nos casos positivos, embora sem atingir significação estatística (figura 5.27).

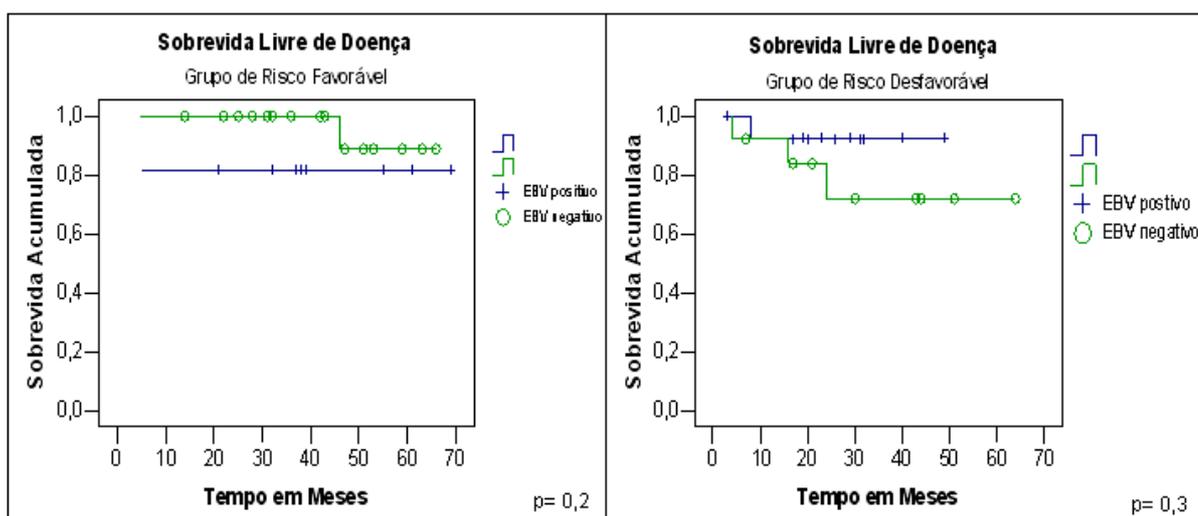


Figura 5.27: Sobrevida livre de doença nos grupos de risco favorável e desfavorável em relação à presença do vírus Epstein-Barr.

6- DISCUSSÃO

O entendimento atual do câncer o considera como uma doença multifatorial, cujas múltiplas etapas consistem em alterações genéticas particulares interagindo com fatores ambientais, sobre um fundo composto pelas características genéticas dos indivíduos em risco. A heterogeneidade apresentada pelo linfoma de Hodgkin, quanto às características demográficas, histopatológicas e clínicas, é um exemplo acabado da intervenção potencial destes fatores em diferentes contextos geográficos. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi estudar um grupo de crianças diagnosticadas com linfoma de Hodgkin no INCA, quanto as suas características clínico-epidemiológicas, histológicas, assim como a frequência de associação com o vírus Epstein-Barr.

6.1 Características Clínicas e Demográficas

O linfoma é a terceira neoplasia mais comum da infância e o linfoma de Hodgkin representa 10-30% de todos os linfomas nessa faixa etária (Jaffe et al, 2001).

Nesta série, foi encontrada uma mediana de idade de 14 anos (faixa: 3 a 18 anos) sendo que 24,6% das crianças tinham até 10 anos ao diagnóstico e 75,4% mais de 10 anos. Assim, a prevalência foi maior entre os adolescentes, conforme o esperado para países em desenvolvimento, onde o primeiro pico de incidência do linfoma de Hodgkin ocorre na adolescência (Gufferman e Delzell, 1984).

Sabidamente, há uma discreta prevalência de acometimento no sexo masculino em relação ao sexo feminino, sendo mais marcante nas crianças menores de 10 anos (Spitz et al, 1986). Neste estudo, foram incluídas 65 crianças e houve um discreto predomínio de pacientes do sexo masculino (58,5%), resultando numa

proporção de sexos de 1,4:1. Ao contrário do que é referido na literatura, não houve um predomínio exuberante de crianças do sexo masculino no grupo de até 10 anos (M:F → 1,6:1) em relação ao grupo de maior idade (M:F → 1,3:1).

A mediana etária no grupo de doentes do sexo masculino (13,5 anos) foi discretamente menor do que nas meninas (15 anos) devido à existência de maior número de casos com baixa idade no sexo masculino em relação ao feminino.

O intervalo entre o início dos sinais/sintomas e o diagnóstico apresentou uma mediana de 120 dias; a maioria dos pacientes (57,9%) teve o diagnóstico num período de tempo inferior ao da mediana. Curiosamente, os pacientes oriundos da região metropolitana do Rio de Janeiro tiveram um maior período de evolução da doença até o diagnóstico: 70% com mais de 120 dias de intervalo. Já as crianças procedentes do município do Rio de Janeiro e do interior do Estado tiveram diagnóstico mais precoce. Por se tratar de um estudo retrospectivo, não foi possível determinar as causas destas diferenças.

Em relação à apresentação clínica, a massa mediastinal foi encontrada em 68% dos casos, semelhante à frequência observada na literatura (60%) (Donaldson et al, 1982). Os sintomas B foram relatados em 39,3% dos pacientes, representando uma discreta prevalência em relação à literatura que varia entre 20 a 30% (Carbine et al, 1971; Oguz et al, 2005).

No Brasil, metade dos casos de linfoma de Hodgkin em crianças é do estadio I e II (52,8%) (Bruniera et al, 2006). Nesta série, não houve diferença do panorama nacional uma vez que 54,1% das crianças também apresentavam os mesmos estadios. A equidade também foi mantida ao se distribuir os casos nos grupos de doença favorável e desfavorável.

Isto contrasta com o observado nos adultos com linfoma de Hodgkin. Em um estudo no Rio de Janeiro, Loureiro et al (2004) acharam 78% dos casos com doença avançada ao diagnóstico, semelhante ao descrito para Campinas (Vassalo et al, 2001). Um estudo prévio com linfoma de Hodgkin de adultos em instituição pública no Rio de Janeiro (Spector et al, 1993), propôs que a doença avançada ao diagnóstico observada nos pacientes poderia ser devida ao atraso diagnóstico (mediana 5 meses, faixa 1-36) (Spector et al, 1993). Ao contrário, o nosso estudo mostra que o tempo de evolução da doença até o diagnóstico não está relacionado com o estágio, no grupo pediátrico estudado, sugerindo que as diferenças entre adultos e crianças quanto à gravidade da doença ao diagnóstico, estaria refletindo diferenças biológicas.

6.2 Características Histológicas e Imunofenotípicas

O subtipo EN foi o mais freqüentemente achado (82,8%), seguido pela CM (12,5%); o que contrasta com outros estudos de linfoma de Hodgkin na infância que afirmam ser a CM o subtipo histológico mais comum na faixa etária pediátrica (Zhou et al, 2001). Na Argentina, foi mostrado numa série pediátrica de 41 casos que a CM era o subtipo histológico mais comum (61%) e a EN representava apenas 22% dos casos (Preciado et al, 1995). O mesmo grupo, desta vez com um maior número de casos, publica em 2003 um estudo com 92 casos de linfoma de Hodgkin (mediana de 8 anos) e reafirma que a CM foi o subtipo mais prevalente (54%), seguido da esclerose nodular (32,5%) (De Matteo et al, 2003). No Brasil, o mais recente estudo com linfoma de Hodgkin em crianças mostra, numa série de 90 casos da Bahia, o predomínio da CM (55,5%) (Araujo et al, 2006). O mesmo ocorre com diversos estudos realizados nos países em desenvolvimento (Zhou et al, 2001).

Por outro lado, os estudos conduzidos nos países desenvolvidos não evidenciaram o expressivo predomínio da CM, algumas vezes, inclusive, tendo uma prevalência inferior ao da EN. Ambinder e colaboradores mostraram, numa série de 25 casos pediátricos dos EUA, um predomínio da EN (60%) (Ambinder et al, 1993). O mesmo aconteceu num estudo britânico onde houve um predomínio da EN (48,6%) em relação à CM (27%) (Weinreb et al, 1996). Recentemente, um grupo alemão publicou uma série com 842 casos pediátricos, em que 549 (65%) eram de EN e 190 (23%) de CM (Claviez et al, 2005). Exceções têm sido encontradas nas quais países em desenvolvimento apresentam um predomínio de casos da esclerose nodular como no Quênia e na Costa Rica (Weinreb et al, 1996) e países desenvolvidos como a França (Brousset et al, 1993) e o Japão (Kusuda et al, 1998) exibem uma prevalência da celularidade mista. A tabela 6.1 mostra um resumo dos principais estudos realizados incluindo população pediátrica.

Esta diversidade pode ser conseqüente a diferenças etárias nos estudos publicados, divergências no emprego dos critérios histológicos para o diagnóstico dos subtipos histológicos e/ou desigualdade no nível sócio-econômico da população analisada. Fatores genéticos, entretanto, não podem ser excluídos.

Em relação à idade, a maioria dos estudos mostra uma maior associação da CM com idades baixas, geralmente inferiores a 10 anos (Herbertson e Hancock, 2005), logo, nos estudos em que a mediana etária é maior, pode haver um predomínio de casos com EN. Nós encontramos uma mediana de 14 anos na nossa população analisada o que pode ter contribuído para uma maior prevalência da esclerose nodular.

Entretanto, a CM esteve mais associada às crianças com até 10 anos de idade. Este resultado é compatível com a literatura que mostra um predomínio da

CM neste grupo de menor idade, mesmo quando a CM não é o subtipo histológico mais prevalente (Weinreb et al, 1992; Ambinder et al, 1993; Armstrong et al, 1993; Brousset et al, 1993; Chang et al, 1993; Claviez et al, 1994; Kanavaros et al, 1994; Huh et al, 1996; Leoncini et al, 1996; Weinreb et al, 1996; Andriko et al, 1997; Peh et al, 1997; Razzouk et al, 1997; Kusuda et al, 1998; Zhou et al, 2001; De Matteo et al, 2003; Chang et al, 2005; Claviez et al, 2005; Araujo et al, 2006). Não existe, na literatura, uma explicação formal para esta associação. Talvez, as células neoplásicas neste grupo etário secretem menos citocinas esclerosantes (TGF- β , IL-1, IL-9, IL-13, LIF, PDGF e TNF) e/ou a imaturidade do sistema imune exerça alguma influência na determinação do subtipo histológico.

Divergências no emprego dos critérios histológicos para o diagnóstico dos subtipos histológicos podem ser responsáveis por parte das discrepâncias observadas na literatura. 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 (Lukes e Butler, 1966). Caracteristicamente, 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 (Lukes, 1971; Buttler e Pugh, 1993). São nestes casos de EN mínima em que há erros na categorização do subtipo do linfoma de Hodgkin e conseqüentemente, casos que deveriam ser classificados como EN são erroneamente chamados de CM. Neste trabalho, foi seguido o critério de que os casos de linfoma de Hodgkin que exibiram células lacunares e bandas colágenas em associação com espessamento da cápsula do

linfonodo, mesmo na ausência de um nódulo bem formado, foram classificados como esclerose nodular (Lukes e Butler, 1966; Lukes, Butler e Hickd, 1966; Strum e Rappaport, 1971; Kadin, Glatstein e Dorfman, 1971; Rappaport et al, 1971).

O nível sócio-econômico parece estar relacionado de forma indireta com o subtipo histológico, pois nos grupos de melhor status social o linfoma de Hodgkin “pediátrico” acomete com maior freqüência crianças mais velhas e adolescentes (Correa e O’Conor, 1971; Jarret, 2002), os quais exibem mais comumente a EN como o subtipo histológico (Harris, 1998). A Turquia é um grande exemplo de como a melhoria do nível sócio-econômico pode influenciar na mudança do perfil histológico do linfoma de Hodgkin infantil. Os estudos publicados naquele país mostram uma diminuição da prevalência da CM em detrimento do aumento da EN, ao mesmo tempo em que as condições sócio-econômicas da população melhoraram (Ertem et al, 1997; Buyukpamukçu et al, 1999; Oguz et al, 2005). No nosso estudo, a EN pode ter sido mais prevalente não só em decorrência da maior mediana de idade da população analisada (14 anos) como também, apesar da pouca informação, do provável melhor nível sócio-econômico quando comparado com os casos do nordeste brasileiro (Araujo et al, 2006).

O grau da EN neste estudo mostrou freqüência semelhante entre os 2 tipos (grau I /grau II), o que difere dos achados da literatura onde há um predomínio do grau I (73 a 83%) (Haybittle et al, 1985; MacLennan et al, 1989; Wijnhuizen et al, 1989; Ferry et al, 1993). Esta diferença deve-se provavelmente as características biológicas da doença e não a diferenças no tempo de evolução da doença (intervalo entre o início dos sinais/sintomas e o diagnóstico) já que a maioria dos casos de esclerose nodular grau II tiveram um menor intervalo de tempo (65,3% dos pacientes

com até 120 dias) em comparação aos casos de esclerose nodular grau I os quais tiveram maior tempo de evolução (59% das crianças com mais de 120 dias).

Em relação aos subgrupos etários, os casos de menor idade estiveram associados à esclerose nodular grau I, enquanto os pacientes com mais de 10 anos exibiram com maior frequência a esclerose nodular grau II. Alguns autores acreditam que a esclerose nodular grau II represente uma doença biologicamente mais agressiva (Bennet et al, 1981, 1983; von Wasielewski et al, 2003). Outros autores acreditam que embora seja uma entidade bem definida, é ainda bastante heterogênea tanto na sua aparência histológica, quanto na sobrevida (MacLennan et al, 1989). Caracteristicamente, além do maior número de células H-RS, a esclerose nodular grau II possui um maior número de células neoplásicas anaplásicas (Lukes e Butler, 1966). Não encontramos estudos em linfoma de Hodgkin pediátrico que compare o grau da esclerose nodular entre os grupos etários. No nosso estudo, os resultados sugerem diferenças biológicas dos 2 grupos etários em relação à EN, embora a significação estatística tenha sido perdida na regressão logística. Uma ampliação da amostra é necessária para que se possa chegar a conclusões definitivas.

O padrão interfolicular, caracterizado pela presença de folículos benignos reativos, é pouco freqüente no linfoma de Hodgkin (Lukes, 1971; Dogget, Colby e Dorfman, 1983). Poucos estudos referem a existência deste padrão e a prevalência parece variar de acordo com a região geográfica. Num estudo conduzido em crianças americanas, o padrão interfolicular foi observado em apenas 8 (16%) de 44 casos (Andriko et al, 1997). Já numa série chinesa de casos de linfoma de Hodgkin infantil, o referido padrão foi encontrado em 62 (60%) dos 104 pacientes (Zhou et al, 2001). Neste estudo, o padrão interfolicular foi encontrado em 15,4% das crianças;

valor próximo ao observado pelo grupo americano. Estas divergências podem estar relacionadas à prevalência diferenciada dos subtipos histológicos, uma vez que o padrão interfolicular está mais associado à CM (Lukes, 1971). No nosso estudo e no do grupo americano, a EN foi mais comum (e o padrão interfolicular menos prevalente); já na série chinesa, a CM foi mais freqüente (assim como o padrão interfolicular) (Andriko et al, 1997; Zhou et al, 2001).

A presença de um padrão interfolicular no linfoma de Hodgkin pediátrico foi considerada como sinal de uma doença linfonodal precoce (Zhou et al, 2001); nós achamos um resultado diverso, pois 80% dos casos com padrão interfolicular esteve associado a maior tempo de evolução da doença (≥ 120 dias). O padrão interfolicular seria a tradução de uma doença mais indolente? Os resultados por nós obtidos não apóiam esta idéia, já que as associações com o estadiamento, grupo de risco, sintomas B, SG e SLD foram todas sem significação estatística. O que de fato leva os pacientes com linfoma de Hodgkin padrão interfolicular terem mais tempo de evolução da doença, ainda carece de uma resposta formal.

Uma das características do linfoma de Hodgkin é a presença de poucas células neoplásicas e um predomínio das células inflamatórias. A freqüência das células H-RS varia entre 0,1 a 10% em relação à quantidade celular total (Jaffe et al, 2001; Crawford, 2001) e o que realmente leva a esta variedade na freqüência é pouco conhecido. É provável que o infiltrado linfocitário tenha uma grande influência no número de células neoplásicas. Isto se deve a uma importante característica deste linfoma, que é a composição de células T do tipo Th2 e T regulatórias, e a baixa freqüência de células Th1, citotóxicas e natural killer (NK). As células H-RS parecem induzir este infiltrado pela produção de quimiocinas de tipo Th2. Por exemplo, as células H-RS secretam TARC (*thymus and activation regulated*

chemokine), uma citocina Th2, que leva os linfócitos CD4 do tipo Th2 a se acumularem ao redor das células neoplásicas (van den Berg, Visser e Poppema, 1999). Os linfócitos parecem produzir um microambiente tumoral favorável à sobrevivência das células H-RS e ao escape do sistema imunológico (Poppema, 2005). Assim, o LH é o protótipo do linfoma em que a patogênese, sobrevida e progressão têm sido tradicionalmente associados à resposta imune (Álvaro et al, 2005).

Poucos são os trabalhos que utilizam o número absoluto de células H-RS como variável (Axdorph et al, 2001). Neste estudo, a contagem absoluta variou de 5 a 307 em 10 CGA (mediana de 40 células). A distribuição de casos pela mediana (≤ 40 versus > 40 células por 10 CGA) exibiu frequência semelhante entre os grupos. A quantidade de células neoplásicas foi incluída neste estudo a fim de determinar o seu papel nas características clínico-histológicas do linfoma de Hodgkin pediátrico.

Ao se dividir os casos pela mediana (40 células H-RS em 10 CGA), houve uma tendência de um menor número de células neoplásicas na CM e um maior número na EN ($p= 0,08$). Isto decorre de um maior número de casos da EN, sobretudo a de grau II que por definição possui um maior número de células H-RS do que a de grau I. Como esperado, a EN grau II esteve correlacionado com um maior número de células neoplásicas ($p= 0,00002$). Axdorph et al (2001), no único estudo a abordar o número de células neoplásicas em 10 CGA como variável, também observaram que a EN esteve correlacionada com um maior número de células neoplásicas e a CM com um menor número ($p= 0,001$) (Axdorph et al, 2001). A ampliação deste estudo permitirá confirmar estes resultados preliminares, assim como o do estudo mencionado.

Assim como o número de células H-RS, o índice mitótico também mostrou tendência de associação com o subtipo histológico. A EN tendeu a um menor índice (≤ 10 mitoses em 10 CGA), enquanto na CM houve uma equidade do índice mitótico entre o total de casos ($p= 0,06$). Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que estudasse este tipo de associação. Apesar do pequeno tamanho da amostra, 83% dos casos de esclerose nodular tiveram ≤ 10 mitoses em 10 CGA, enquanto na celularidade, 50% dos casos apresentaram este índice. Glimelius e colaboradores propõem que a IL-9 estaria relacionada com a proliferação das células H-RS e que o número de eosinófilos seria uma maneira indireta de determinar a presença de altos níveis de IL-9 (Glimelius et al, 2006). Neste estudo, não foi encontrada qualquer relação entre o infiltrado eosinofílico e o número de mitoses, assim como com o número de células neoplásicas, em concordância com Axdorph et al (2001).

Na determinação do grau da esclerose nodular, o número de células H-RS tem papel fundamental, porém, o índice mitótico não é levado em consideração. Neste estudo, 88,8% dos casos de esclerose nodular grau II tiveram mais de 10 mitoses em 10 CGA ($p= 0,01$). O significado estatístico foi mantido na regressão logística, indicando que o grau da esclerose nodular pode influenciar no número de células H-RS em mitose. Provavelmente, isto seja secundário à alta expressão de IL-13 a qual está relacionada à fibrose na EN e à proliferação das células neoplásicas por um mecanismo autócrino (Ohshima et al, 2001; Skinnider et al, 2001).

Neste estudo, foi realizada uma caracterização imunofenotípica dos linfomas, utilizando os marcadores CD30, CD15 e CD20, considerados como clássicos no diagnóstico do linfoma de Hodgkin. Os resultados obtidos encontram-se em concordância com o descrito na literatura para esta doença.

O CD30 é um membro da superfamília dos receptores de necrose tumoral (TNFR), encontrado nos linfócitos ativados e nas células H-RS (Blazar et al; 2004; Staber et al, 2006). Praticamente, quase todos os casos de linfoma de Hodgkin exibem células H-RS positivas para o CD30 (Stein et al, 1985). A imunoexpressão do CD30 no linfoma de Hodgkin está diretamente relacionada ao método de visualização utilizado. Ao se utilizar a técnica da estreptoavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB+, Dako), o percentual de casos positivos, bem como o número de células neoplásicas positivas para o CD30 foi inferior ao da técnica do conjugado polimérico (Kit EnVision+, Dako), realizado no TMA (LSAB, 49/65 casos 75% foram CD30 positivos vs 58/65, 89%). Este resultado foi anteriormente relatado na literatura (Sabattini et al, 1998; Belling et al, 1999; Kammerer et al, 2001). Assim, com a utilização do método mais sensível, não houve diferença dos resultados encontrados na literatura para a imunoexpressão de CD30 (aproximadamente 90%) (Stein et al, 1985; Chittal et al, 1988; Agnarsson e Kadin, 1989). Isto mostra que para o CD30, a técnica do conjugado polimérico deve ser considerada como o melhor método de visualização para o linfoma de Hodgkin quando o anticorpo pesquisado for o CD30.

O CD15 foi originalmente utilizado como um marcador de células mielóides e monocíticas. Posteriormente, foi reconhecido como um marcador de células H-RS. Sua expressão pode ser observada em 68 a 95% dos casos de linfoma de Hodgkin. (Stein et al, 1982; Hsu e Jaffe, 1984; Pinkus, Thomas e Said, 1985; Tzankov et al, 2003a). Neste estudo, 43 pacientes (66,2%) apresentavam imunopositividade para o CD15.

Embora a grande maioria dos casos de linfoma de Hodgkin seja derivada de células B do centro germinativo (Poppema, 2005; Re et al, 2005), apenas 20 a 33% expressam o CD20 (Schmid et al, 1991; Watanabe et al, 2000; Rassidakis et al,

2002a; Tzankov et al, 2003a; Tzankov et al, 2003b). Neste estudo, 18 pacientes (27,7%) foram positivos para o CD20, não divergindo dos demais trabalhos. A maioria dos casos (50%) exibiu imunoexpressão em mais de 75% das células neoplásicas. A marcação para o CD20 é bastante diversa, variando de 2 a 100% das células neoplásicas (Schmid et al, 1991; Zukerberg et al, 1991; Rassidakis et al, 2002a). A variedade de casos positivos para o CD20 pode ser secundária às seguintes diferenças: fixação dos tecidos; técnicas de imunohistoquímica; pontos de corte na categorização da positividade e/ou; mesmo que pequena, a inclusão de casos outros que não o linfoma de Hodgkin clássico (como o linfoma de Hodgkin predomínio linfocítico nodular e o linfoma não Hodgkin de grandes células B rico em células T) (Macon et al, 1992; von Wasielewski et al, 1997a).

A imunoexpressão do Ki-67 foi observada em 94,6% dos casos avaliáveis, com um índice alto de proliferação celular em 52,8% dos casos. Os resultados obtidos não foram muito díspares daqueles observados por outros estudos (46% e 57% dos casos com alto índice de proliferação celular) (Garcia et al, 2003; Montalbán et al, 2004).

O índice de proliferação celular não mostrou associação com nenhuma das variáveis descritas. Enquanto o índice mitótico só leva em consideração as células que estejam se dividindo, o Ki-67 marca todas as células que não estejam na intérfase o que acarreta diferença na determinação de um fenótipo proliferativo. Levando-se em consideração o número de mitoses, 20% dos pacientes apresentaram um alto índice proliferativo, enquanto, ao se utilizar a expressão do Ki-67, 47,2% dos casos têm um elevado índice proliferativo. O fato de uma célula não estar em G0 não significa que ela irá completar o processo de mitose, logo a utilização do Ki-67 poderia representar um viés, justificando a perda das

associações obtidas em relação ao número de células neoplásicas. Isto também sugere que o índice mitótico é um marcador de proliferação celular mais específico que a imunexpressão de Ki-67, para o linfoma de Hodgkin.

O número de mitoses das células H-RS em 10 CGA é pouco explorado nos estudos. A literatura é extensa nos estudos de genes e proteínas envolvidas diretamente ou indiretamente com a mitose no linfoma de Hodgkin, porém, a determinação das mitoses pelos métodos convencionais de microscopia óptica e lâminas de HE não tem sido pesquisada. Já a contagem do número de mitoses é bastante explorada em outras neoplasias como no carcinoma ductal infiltrante, no melanoma maligno e nos sarcomas (Elston e Ellis, 1991; Azzola et al, 2003; Coindre et al, 2001). Nos carcinomas da mama e nos sarcomas, por exemplo, o número de mitoses é utilizado inclusive para se classificar o grau do tumor (Bloom e Richardson, 1957; Costa et al, 1984).

Neste estudo, o número de mitoses variou de 0 a 71 em 10 CGA (mediana de 4 células em 10 CGA). Os casos só foram considerados como de alto índice mitótico quando exibiram mais de 10 mitoses em 10 CGA. Desta forma, treze pacientes (20%) foram considerados como de alto índice mitótico o que contrasta com o único estudo encontrado na literatura, onde um elevado índice mitótico (> 10 mitoses em 10 CGA) foi observado só em 10% dos casos (Nguyen et al, 1989).

A composição do microambiente tumoral no linfoma de Hodgkin é bastante heterogênea (Lukes e Butler, 1966). Há uma população celular variável formada por linfócitos, plasmócitos, histiócitos, neutrófilos e eosinófilos. A migração dos eosinófilos tem sido relacionada à expressão de IL-9 (Glimelius et al, 2006) e CCL28 (Hanamoto et al, 2004) pelas células H-RS e a expressão de eotaxina (CCL11) pelos fibroblastos (Jundt et al, 1999; Re, Küppers e Diehl, 2005). Nós

encontramos uma variação grande no número de eosinófilos (Eo): 0 a 3600 por 10 CGA (mediana de 36). Mais uma vez, a distribuição dos casos pela mediana (≤ 36 versus >36 Eo por 10 CGA) mostrou semelhança entre os grupos. Um proeminente infiltrado eosinofílico é encontrado entre 3 e 38% dos casos de linfoma de Hodgkin (Toth et al, 1977; von Wasielewski et al, 2000a; Axdorph et al, 2001). Neste estudo, 16 pacientes (26,2%) apresentavam um infiltrado de Eo acentuado, o que não difere do encontrado na literatura.

Uma relação inversa foi observada entre a imunexpressão do CD20 e o infiltrado eosinofílico. Os casos CD20 negativos foram correlacionados tanto com um maior número de eosinófilos em 10 CGA, quanto com uma maior intensidade do infiltrado eosinofílico. Porém, houve perda da significação estatística com a regressão logística.

Por outro lado, foi encontrada uma associação inversa entre a imunexpressão do CD20 e a leucometria. Os casos com o imunofenótipo B estavam associados com a leucopenia. Já os casos CD20 negativos, apresentavam leucocitose mais frequentemente. Esta associação poderia funcionar como uma medida indireta do infiltrado eosinofílico tumoral pois, como mostrado anteriormente, os casos CD20 positivos eram os que tinham menor número de eosinófilos no microambiente tumoral, ao contrário dos que eram CD20 negativos os quais estavam relacionados a um maior infiltrado eosinofílico ($p= 0,03$). Como os eosinófilos existentes no microambiente tumoral migram do sangue periférico para os tecidos, a associação entre o CD20 e a leucometria poderia ser um reflexo da relação entre o CD20 e o infiltrado eosinofílico tumoral. Estas associações foram verdadeira apenas na análise univariada e perderam significação na regressão logística. Talvez, isto seja secundário ao tamanho da amostra ou então a real

inexistência de associação entre as referidas variáveis. O CD20 é semelhante aos canais de Ca^{2+} e está envolvido na transdução de sinais para a diferenciação e proliferação de células B, assim como na passagem do ciclo celular de G0 para G1 (Tzankov et al, 2003). Logo, o CD20 parece não ter relação direta com os eosinófilos. Se de fato há alguma relação entre a imunexpressão do CD20 e o número de eosinófilos no microambiente tumoral, talvez seja conseqüente às diferenças na concentração e/ou tipos de citocinas envolvidas na migração dos eosinófilos. Ou seja, as células H-RS CD20 positivas secretariam menos citocinas eosinofílicas do que as CD20 negativas.

O infiltrado eosinofílico tumoral também esteve associado à leucometria. A associação com a mediana de eosinófilos (≤ 36 x >36 em 10 CGA) mostrou uma tendência de associação ($p= 0,09$), enquanto a relação com a intensidade do infiltrado eosinofílico foi estatisticamente significativa ($p= 0,01$). A regressão logística mostrou uma tendência de associação ($p= 0,056$) que com o aumento da amostra, talvez mostre significância. Estes resultados ilustram o que havia sido dito anteriormente: o número de eosinófilos no tecido tumoral depende da quantidade de eosinófilos existentes no sangue periférico. As citocinas eosinofílicas produzidas pelas células H-RS e pelas células do microambiente tumoral (sob estímulo das células neoplásicas) devem cair na circulação periférica e ir até a medula óssea estimular a série mielóide a produzir mais eosinófilos.

No processo etiopatogênico do linfoma de Hodgkin, a proteína pró-apoptótica BAX parece ter algum papel. Sua função, como a de todos os membros da família Bcl2, é regulada por um balanço de homo/heterodimerização. Como homodímero (BAX/BAX) cumpre função pró-apoptótica, enquanto a heterodimerização com Bcl-2 (BAX/Bcl-2) inibe esta função (Brousset et al, 1996). A

imunoexpressão de BAX tem sido observada entre 28 a 97% dos casos de linfoma de Hodgkin (Brousset et al, 1996a; Kanavaros et al, 2003; García et al, 2003; Kim et al, 2004), dependendo do ponto de corte. Neste estudo, nós encontramos positividade em 68,5% dos casos avaliados, porém, devido ao já mencionado balanço, não significa que todos estes casos estejam direcionados para um “fenótipo apoptótico”, pois só os casos positivos para BAX e negativos para Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-x é que estariam comprometidos com a morte celular (Brousset et al, 1996) (figura 6.1). A proposta futura deste estudo é continuar com a caracterização do perfil apoptótico das células H-RS através da avaliação de Bcl-2, Mcl-1 e Bcl-x, servindo-se das facilidades da tecnologia do TMA.

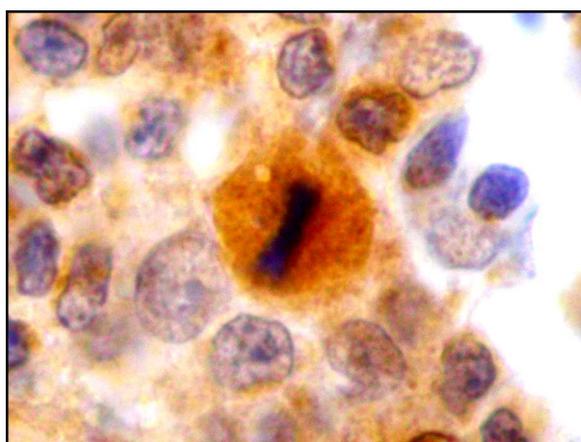


Figura 6.1: Célula neoplásica em mitose positiva para BAX (caso 43), 100x. Este é um exemplo de que a imunoexpressão do BAX por si só não é garantia de que a célula entrará em apoptose.

Em relação às características clínicas, os casos BAX positivos estiveram associados a ausências de sintomas (“sintomas A”), já os casos BAX negativos estiveram relacionados aos sintomas B. Na literatura, os estudos envolvendo o BAX

estão voltados apenas para as questões moleculares e histológicas (Brousset et al, 1996; Kanavaros et al, 2002; Garcia et al, 2003; Kim et al, 2004;). A única exceção é para um estudo de Rassidakis e colaboradores, mas incluindo apenas pacientes adultos (Rassidakis et al, 2002b). Esta é a primeira vez que um estudo associa o BAX com características clínicas do linfoma de Hodgkin pediátrico. Assim como Rassidakis, nós também encontramos uma associação entre os casos considerados positivos para o BAX e a ausência de sintomas, que se manteve na regressão logística. Talvez a expressão de BAX (nos níveis considerados no ponto de corte deste estudo) esteja, de fato, associada a um menor número de células H-RS já que mais células entrariam em apoptose. Esta situação de um menor número de células neoplásicas poderia levar a uma menor concentração de citocinas (TNF, LT-a, IL-1, IL-6) responsáveis pela sintomatologia “B” do linfoma de Hodgkin.

A frequência das mutações de p53 é menor no linfoma de Hodgkin do que em outras neoplasias (Montesinos-Rongen et al, 1999; Maggio et al, 2001; Kim et al, 2006). Isto, entretanto, não significa que esta importante molécula não esteja envolvida patogenicamente neste linfoma. Algumas evidências indicam que a expressão aberrante de proteínas reguladoras de p53, como p14ARF e Mdm2, é o mecanismo de inativação preferencial da função do p53. Mdm2, por exemplo, liga-se ao domínio de transativação do p53 bloqueando sua capacidade transcricional (Re et al, 2006). A positividade do p53 no linfoma de Hodgkin pode variar de 29,5% a 92,85% a depender do ponto de corte utilizado (Morente et al, 1997; Garcia et al, 2003; Montalbán et al, 2005). Nós encontramos 80,4% dos casos com algum tipo de positividade para o p53, porém como definido na metodologia, apenas 44,6% dos casos foram considerados positivos. Outros estudos imunohistoquímicos, como o da

expressão de p21 e Mdm2, são necessários para determinar a funcionalidade da proteína p53.

A co-expressão de p53 e um alto índice de proliferação celular (Ki-67 \geq 51%) foi observada em 30,35% dos pacientes ($p= 0,01$). Este tipo de associação é também vista em outros estudos (Garcia et al, 2003; Kim et al, 2006). A regressão logística mostrou uma tendência de associação, possivelmente pelo baixo número de casos. Por outro lado, não foi encontrada relação entre os casos p53-positivos e um alto índice mitótico (> 10 mitoses em 10 CGA). É sabido que o p53 pode se acumular em resposta ao dano do DNA e promover a parada do ciclo celular ou encaminhar a célula à apoptose (Bellamy, 1996) o que justificaria o baixo número de células em mitose neste estudo (e a conseqüente perda de associação). Ou seja, um grande número de células H-RS estaria fora da intérfase (como mostrado pelo Ki-67), porém devido a possível ação do p53 a maioria destas células teria a proliferação celular bloqueada. Um contingente significativo destas células deve ser encaminhado à apoptose o que explica a tendência de associação obtida com a regressão logística entre o p53 e o BAX ($p= 0,059$). Outros estudos imunohistoquímicos e celulares seriam necessários para demonstrar esta hipótese.

6.3 O Papel do TMA no Linfoma de Hodgkin

A utilização do *tissue microarray* (TMA) permite o estudo simultâneo de até 500 fragmentos (cores) de tumores fixados e incluídos em parafina (Kononen et al, 1998; Bubendorf et al, 2001; Packeisen et al, 2002; Hedvat et al, 2002). Vários trabalhos têm demonstrado uma equivalência de resultados entre a metodologia convencional e o TMA, tanto em linfomas, quanto em tumores sólidos (Camp et al, 2000; Leversha et al, 2003; Griffin et al, 2003).

Como o linfoma de Hodgkin se caracteriza por possuir uma pequena população de células neoplásicas, optou-se neste estudo pela realização de 2 cores por cada caso, a fim de garantir a representatividade da neoplasia. Graças a esta medida, foi possível ampliar o número de casos avaliáveis para cada anticorpo testado (CD30, BAX, Ki-67 e p53).

Embora o número total de casos neste estudo tenha sido de 65 pacientes, na confecção do TMA só foi possível alocar 57. Em oito, a quantidade de tumor FIP foi insuficiente. Na avaliação do número de células H-RS, a duplicação dos casos permitiu que 56 dos 57 casos tivessem células neoplásicas em número suficiente para garantir a representatividade do linfoma. Os marcadores celulares testados nas lâminas de TMA permitiram avaliar o papel das duplicatas na eficiência do sistema, observando-se, em todos os casos, um aumento significativo na frequência de detecção, devido a possibilidade de se avaliar maior número de células neoplásicas.

Em suma, a utilização preliminar do TMA para estudos imunohistoquímicos no linfoma de Hodgkin mostra que este é um método eficiente, uma vez que cada core pode garantir a representatividade da neoplasia. A realização de duplicatas em sua confecção é uma estratégia que possibilita um rendimento final de casos maior.

6.4 Fatores Histológicos e Imunohistoquímicos Influenciadores das Características Clínicas

O objetivo de se avaliar o número de células H-RS era tentar estabelecer alguma relação com o estadiamento e/ou grupo de risco, para responder às perguntas: Quanto maior o número de células maior seria a “quantidade de

doença”? Quanto maior o número de células maior a possibilidade de se ter sintomas B?

A busca por refinamento na estratificação dos pacientes com linfoma de Hodgkin tem sido o objetivo de muitos estudos (Vassilakopoulos et al, 2001; Gisselbrecht et al, 2005; Oguz et al, 2005): descobrir quais enfermos devem receber tratamento mais agressivo devido ao maior risco de recaída e quais podem ter um regime terapêutico menos intensivo com diminuição da toxicidade sem comprometer a SLD. Esta é a primeira vez que o número de células H-RS em 10 CGA é correlacionado com o grupo de risco. Levando-se em consideração a baixa população de células neoplásicas normalmente encontrada no linfoma de Hodgkin, era hipotetizado por nós que quanto mais células H-RS, maior seria a chance de acometimento de um maior número de sítios anatómicos, o que estaria diretamente relacionado ao grupo de risco. Como parte da elaboração da hipótese, foi considerado que o número de células neoplásicas poderia influenciar a concentração final das citocinas responsáveis pelos sintomas B. Os resultados iniciais mostraram que quanto mais células, maior o grupo de risco, porém na regressão logística houve perda da significação estatística. O mesmo aconteceu para a massa mediastinal e a presença de sintomas B. A confirmação destas hipóteses certamente requer a inclusão de um maior número de casos para se obter resultados definitivos.

O índice de proliferação celular determinado pela imunoexpressão do Ki-67 esteve associado ao estadiamento tanto na análise univariada, quanto na regressão logística. Só foi encontrado um único estudo na literatura com 62 casos que correlaciona o índice de proliferação celular com o estadiamento. Neste estudo, foi observado um aumento da imunoexpressão do Ki-67 com o aumento do

estadiamento (Wang e Taylor, 2002). Os nossos resultados diferem do obtido por Wang e Taylor, pois encontramos uma associação oposta: maior índice de proliferação associado a menores estadiamentos.

Talvez, os casos com menor índice de proliferação celular reflitam uma doença mais indolente, com menor sintomatologia e, portanto, com maior tempo de evolução o que contribuiria para um maior estadiamento e alocação no grupo de risco desfavorável. Embora não se tenha obtido significância estatística, os pacientes com mais de 120 dias de evolução eram mais frequentemente do grupo de risco favorável, enquanto os com menos de 120 dias pertenciam mais ao grupo de risco desfavorável. A inclusão de mais casos é necessária para uma conclusão definitiva.

6.5 Características Clínico-Laboratoriais

Das relações entre as variáveis clínicas, a massa mediastinal e a leucometria apresentaram associações com significação estatística. A presença da massa mediastinal esteve associada a sintomas B, grupo de risco desfavorável, leucocitose e anemia. Estes resultados eram esperados já que os pacientes com alargamento de mediastino são os que apresentam, com maior freqüência, doença mais avançada (Voüte et al, 1998). A regressão logística entre estas variáveis confirmou associação estatisticamente significante apenas com a leucometria.

Como discutido anteriormente, os casos com mais de 40 células H-RS em 10 CGA eram os que mais frequentemente apresentavam o alargamento de mediastino. Desta forma, os casos com massa mediastinal devem possuir um maior número de citocinas circulantes que terminam por estimular a mielopoiese, refletindo num aumento da série mielóide e a conseqüente leucocitose.

Mesmo com perda da significação na regressão logística, raciocínio semelhante pode ser feito para os sintomas B: maior número de células H-RS → maior quantidade de citocinas causadoras dos sintomas constitucionais. A anemia poderia ser justificada pelo distúrbio no ambiente medular o qual está comprometido para mielopoiese, levando a deficiência na mobilidade de ferro medular (Ratkin et al, 1974) e/ou uma menor eritropoiese. E a associação com o grupo de risco desfavorável, decorre destes pacientes apresentarem, com maior frequência, estadios elevados.

Ainda em relação as variáveis clínico-laboratoriais, a leucometria esteve relacionada aos sintomas B e tempo de evolução da doença. Os pacientes com leucocitose foram os que mais apresentaram sintomas B. A relação manteve a significação estatística na regressão logística ($p= 0,01$), sugerindo que alguma das citocinas responsáveis pelos sintomas constitucionais deve atuar na medula óssea estimulando a mielopoiese. A leucocitose esteve associada ainda a um maior tempo de evolução da doença (> 120 dias) e contagens normais de leucócitos estiveram relacionadas a um menor tempo de evolução. Talvez a leucocitose seja secundária a um tempo maior de estímulo da medula óssea pelas citocinas produzidas pelas células H-RS (ou pelas células do microambiente tumoral sob estímulo das células neoplásicas). Esta estimulação prolongada poderia acarretar em uma maior mielopoiese, justificando a referida associação. Um estudo encontra-se em curso, com o objetivo de analisar as biopsias de medula óssea dos casos estudados ao diagnóstico a fim de avaliar as alterações das séries hematopoiéticas e correlacioná-las com a expressão de citocinas particulares no microambiente tumoral. Os resultados deste estudo poderão dar apoio experimental a algumas das questões levantadas nesta parte do estudo.

6.6 Associação do Vírus Epstein-Barr com o Linfoma de Hodgkin Pediátrico

A associação causal entre o vírus Epstein-Barr e o linfoma de Hodgkin é hipotetizada há muitos anos devido aos achados epidemiológicos e sorológicos encontrados nos pacientes com esta neoplasia. O primeiro caso com células positivas para o EBV foi descrito há cerca de 20 anos (Poppema et al, 1985) e desde então muitos estudos têm relatado a associação deste vírus em diversas populações afetadas pelo linfoma de Hodgkin. Estima-se que 20% dos casos nos países ocidentais, 40% dos casos na Ásia e 70% na América do Sul estejam associados ao EBV (Jarrett, 2002).

O DNA e o RNA do EBV podem ser detectados através de uma variedade de técnicas sensíveis, incluindo PCR para DNA e RT-PCR para RNA (Brink et 1997; Hassan et al 2006). A hibridização in situ e a imunohistoquímica são também utilizadas para determinar a associação do linfoma de Hodgkin com EBV, sendo vantajosas em relação às técnicas de PCR por permitirem a localização do vírus dentro do tecido neoplásico (eliminando os resultados falso-positivos) e poderem ser aplicadas nos tecidos FIP. Na hibridização in situ, busca-se pela expressão dos transcritos EBERs. No estudo imunohistoquímico (IHQ), procura-se a proteína viral LMP1 e nas técnicas de PCR, um ou vários genes virais.

Neste estudo, 31 casos (47,7%) foram positivos para LMP1 por IHQ, enquanto 24 (36,9%) expressavam os RNAs EBERs. Embora a hibridização in situ seja considerada a melhor técnica de detecção do EBV devido à alta sensibilidade do método (Howe e Steitz, 1986; Preciado et al, 1986) e a inexistência de resultados falso-positivos quando utilizada por patologistas experientes (Kusuda et al, 1998), neste estudo, 7 casos foram falso-negativos por esta metodologia. Este tipo de

discordância entre as duas técnicas já foi relatada por outros autores (Khan et al 1993; Kanavaros et al, 1994; Belkaid et al, 1995; Leoncini et al, 1996; Weinreb et al, 1996; Kusuda et al, 1998) e pode ser devida a problemas de degradação dos EBERs durante o processo de fixação do tumor. Entretanto, estes RNAs parecem ser estáveis e sua abundância faz com que a degradação seja uma hipótese pouco provável. Uma explicação biológica pode surgir dos resultados de um estudo em linfoma de Hodgkin pediátrico, que incluiu casos do sul do Brasil, e que encontrou uma porcentagem de casos EBV positivos (8/24, 33%) em que os EBERs não eram expressos pois o EBV carregava um genoma defetivo, denominada EBVhet, pelo rearranjo de regiões entre o gene EBNA2 e os RNAs EBER1 e 2 (Gan et al, 2002). Estes resultados deram apóio à hipótese de “hit and run” do EBV, pela qual, pelo menos uma parte dos casos de linfoma de Hodgkin EBV negativos, carregariam versões “defetivas” do vírus, como uma marca molecular da presença deste nas etapas iniciais da linfomagênese (Jarret, 2002). Seria interessante, nos nossos casos LMP1 positivos / EBERs negativos, verificar a presença destas variantes moleculares.

Na população estudada, o EBV esteve associado a 47,7% dos pacientes, porém, 3 casos eram de crianças de fora do Estado do Rio de Janeiro (Maranhão, Espírito Santo e Minas Gerais). Um caso do Ceará foi negativo para o vírus. Assim, levando-se em consideração apenas os casos do Rio de Janeiro, a prevalência do Linfoma de Hodgkin EBV-positivo foi de 46%. Este valor é inferior ao esperado para os casos da infância nos países em desenvolvimento o qual varia entre 53 e 100% (tabela 6.1). O valor encontrado foi também inferior ao observado num recente estudo da Bahia onde 86,7% das crianças foram positivas para o EBV (Araujo et al, 2006). É bem conhecida a associação entre o baixo status sócio-econômico e a alta

prevalência do EBV no linfoma de Hodgkin infantil, justificando a maior incidência dos casos associados ao vírus nos países em desenvolvimento (como Peru, Honduras e Kenia) em relação aos países industrializados, como os Estados Unidos (Belkaid et al, 1995; Leoncini et al, 1996; Weinreb et al, 1996; Kusuda et al, 1998; Engel et al, 2000; Zhou et al, 2001; Jarrett 2002; De Matteo et al, 2003; Chang et al, 2005; Jarrett et al, 2005).

Num mesmo país, entretanto, a distribuição da renda, a nível individual e regional, é variável, e isto parece também refletir numa prevalência diversa do EBV. Flavell e colaboradores ilustram bem estas diferenças quando provaram que no Reino Unido os casos de linfoma de Hodgkin EBV-positivos eram oriundos com maior freqüência das comunidades mais pobres (Flavell et al, 2001). Estas diferenças econômicas talvez sejam responsáveis pela diversidade na prevalência do Linfoma de Hodgkin pediátrico EBV-positivo entre o Rio de Janeiro e a Bahia. O Estado do Rio de Janeiro possui o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) e o rendimento médio mensal (RMM) maior que a Bahia (IDH 0,807 vs. 0,68 e RMM R\$ 949 vs. R\$ 492, respectivamente; fontes: Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil e IBGE). Logo, as crianças na Bahia poderiam ter o contágio com o vírus numa idade muito mais precoce do que as crianças do Rio de Janeiro e/ou estariam sujeitas a condições imunodepressoras que favoreceriam a linfomagenese, explicando a maior prevalência do EBV no linfoma de Hodgkin pediátrico daquele Estado do nordeste.

Não foi levada em consideração a prevalência do EBV nos estudos anteriores realizados na região sudeste do Brasil em crianças com linfoma de Hodgkin (Armstrong et al, 1993; Faria et al, 1996; Razzouk et al, 1997; Elgui de Oliveira et al, 2002). Em 24/2/1999, o Ministério da Saúde editou a portaria SAS-55

(Ministério da Saúde, 1999) na qual cria e regula o Tratamento Fora de Domicílio (TFD). O TFD é um instrumento legal que permite através do SUS o encaminhamento de pacientes a outras unidades de saúde a fim de realizar tratamento médico fora da sua microrregião, quando esgotados todos os meios de tratamento na localidade de residência/estado. Isto fez com que a maioria dos pacientes com câncer começasse a ser tratada próximo ao seu domicílio. Anterior a data de publicação da referida portaria, uma grande parte das crianças que recebiam o diagnóstico de câncer (principalmente da região norte e nordeste) eram encaminhadas aos serviços de oncologia da região sudeste, sobretudo os do Estado de São Paulo. Desta forma, os estudos conduzidos nos serviços da região sul e sudeste que relatam a prevalência do EBV em crianças com linfoma de Hodgkin cujo período de inclusão dos casos seja anterior ao de 1999, certamente terão números consideráveis de pacientes da região norte-nordeste, resultando num importante viés epidemiológico. Isto poderia explicar, por exemplo, a alta prevalência do EBV (72%) encontrada por Armstrong e colaboradores (Armstrong et al, 1993) que se aproxima muito mais daquela encontrada no nordeste (Araujo et al, 2006).

Neste estudo, a maioria dos casos positivos para o EBV foi do subtipo EN (74%), embora houvesse uma tendência de associação com a CM (87,5% destes casos eram EBV-positivos) ($p=0,057$). Vários estudos mostram que nos linfomas de Hodgkin EBV-positivos a CM é o subtipo histológico prevalente, seguida da EN (Gandhi, 2004). Na Argentina, 67,2% dos casos positivos para o vírus são CM, enquanto 15,6% são EN (De Matteo et al, 2003). O mesmo é observado nos Estados Unidos (Ambinder et al, 1993; Razzouk et al, 1997), Reino Unido (Weinreb et al, 1992, 1996), França (Brousset et al, 1993), Alemanha (Claviez et al, 1994, 2005), Grécia (Kanavaros et al, 1994), Peru (Chang et al, 1993), Honduras

(Ambiender et al, 1993), China (Zhou et al, 2001), Coréia (Huh et al, 1996), Malásia (Peh et al, 1997), Arábia Saudita (Armstrong et al, 1993), Jordânia (Weinreb et al, 1996), Quênia (Kusuda et al, 1998), Egito (Weinreb et al, 1996), África do Sul (Weinreb et al, 1996), Austrália (Weinreb et al, 1996) e Bahia (Araujo et al, 2006).

Outros estudos mostram um panorama de associação entre o EBV e os subtipos histológicos do linfoma de Hodgkin pediátrico semelhante ao encontrado por nós, ou seja, um predomínio de casos de EN EBV-positivo em relação à CM. No Vietnã, por exemplo, a maioria dos casos associados ao vírus é de EN (56%), enquanto 4,8% são de CM (Chang et al, 2005). Em outros 2 estudos realizados no Quênia com uma população diferente da analisada por Kusuda e colaboradores (Kusuda et al, 1998), houve predomínio da EN nos casos positivos para o EBV (Leoncini et al, 1996; Weinreb et al, 1996). Observações semelhantes são encontradas ainda nos Estados Unidos (Andriko et al, 1997), Grécia (Weinreb et al, 1996), Costa Rica (Weinreb et al, 1996) e Austrália (Weinreb et al, 1996). Esta maior associação entre o EBV e a EN tanto no nosso estudo quanto, nos relatados anteriormente, deve-se a maior prevalência deste subtipo histológico em relação à CM. Como discutido anteriormente, uma maior prevalência da EN em relação à CM pode ser conseqüente a: diferenças etárias nos estudos publicados; divergências no emprego dos critérios histológicos para o diagnóstico dos subtipos histológicos e/ou desigualdade no nível sócio-econômico da população analisada.

Porém, mesmo nos estudos nos quais a CM não predomina, incluindo o nosso, ela é quem exibe a maior associação com o EBV. Neste estudo, por exemplo, dos 31 casos EBV-positivos, 23 eram de EN (74%) e 7 de CM (26%). Mas, dos 53 casos de esclerose nodular apenas 23 estavam associados ao vírus (43,3%); enquanto dos 8 casos de CM, 7 eram EBV-positivos (87,5%).

A razão pela qual a CM está mais associada ao EBV é uma incógnita. O EBV seria responsável pela modulação das citocinas e quimiocinas secretadas pelas células H-RS o que contribuiria para a formação de um subtipo histológico específico? O subtipo histológico seria secundário ao grau de resposta imunológica do hospedeiro contra o tumor? Ainda não há respostas para estes questionamentos. Porém, já está bem definido que o microambiente tumoral é influenciado pelas citocinas e quimiocinas secretadas pelas células H-RS.

A idade possui uma importante relação tanto com a prevalência do linfoma de Hodgkin quanto na associação com EBV. Nos países em desenvolvimento e nos grupos de baixo poder sócio-econômico, observa-se um primeiro pico de incidência do linfoma de Hodgkin em crianças com até 10 anos (Harris, 1998) e é exatamente neste grupo etário onde há uma maior associação com o EBV (Preciado et al, 1986). A justificativa para isso reside no fato de que esta população mais pobre é frequentemente associada às piores condições de saneamento e a um maior número de indivíduos por família, o que favorece a transmissão precoce do EBV pela saliva. Neste estudo, 62,5% das crianças até 10 anos eram EBV-positivas o que não difere da literatura onde a frequência varia entre 43,7% a 100% (Zhou et al, 2001). Mesmo nos países desenvolvidos onde o primeiro pico de incidência do linfoma de Hodgkin ocorre na terceira década de vida, os casos abaixo dos 10 anos são os mais associados ao EBV. Um estudo publicado pelo grupo alemão que incluiu apenas crianças e adolescentes ilustra bem esta afirmativa: dos 842 pacientes, a maioria tinha mais de 10 anos (78,4%), porém foi no grupo etário menor que o EBV foi mais prevalente: 67% nos casos \leq 10 anos x 28% nos casos $>$ 10 anos (Claviez et al, 2005).

Nas crianças com linfoma de Hodgkin maiores de 10 anos, a prevalência do EBV varia entre 9 e 100%, as menores associações são observadas nos países desenvolvidos (< 35%) e as maiores nos países em desenvolvimento (>35%) (Zhou et al, 2001). Duas exceções são encontradas na literatura para este grupo etário: uma no trabalho de Weinreb e colaboradores em que 54,7% das crianças do Reino Unido com linfoma de Hodgkin maiores de 10 anos eram EBV-positivas (Weinreb et al, 1996) e outra na publicação da Argentina onde apenas 30% dos pacientes com mais de 10 anos foram positivos para o vírus (De Matteo et al, 2003). Nós encontramos o EBV em 42,8% dos pacientes maiores de 10 anos, o que não foge do esperado para os países em desenvolvimento.

Armstrong e colaboradores sugeriram que o linfoma de Hodgkin compreenderia, na verdade, três entidades distintas: o linfoma de Hogkin da infância (EBV-positivo e do subtipo CM), o linfoma de Hodgkin do adulto jovem (EBV-negativo e do subtipo EN) e o linfoma de Hodgkin dos idosos (EBV-positivo e do subtipo CM) (Armstrong et al, 1998). Alguns estudos têm ido de encontro a esta teoria (Flavell et al, 2000). As evidências atuais apontam para a inexistência “compartimental” do linfoma de Hodgkin que “obrigue” os casos relacionados ao EBV serem do tipo CM. O que a literatura evidencia e também temos observado no linfoma de Hodgkin pediátrico é a relação direta do EBV com os pacientes menores de 10 anos, independente do subtipo histológico e do nível sócio-econômico, confirmando o papel do vírus na etiopatogênese da doença.

No linfoma de Burkitt, o outro linfoma pediátrico associado ao EBV, foi encontrada numa frequência de associação com o EBV de aproximadamente 60% (Hassan et al, 2006), intermediária entre a observada no Nordeste do país e o Sul do continente (Klumb et al 2004). Em contraste com o linfoma de Hodgkin, no Rio

de Janeiro o linfoma de Burkitt EBV positivo é uma doença da infância precoce (4-5 anos) e foi sugerido por nós que a primoinfecção precoce poderia ter um papel na patogênese desta doença (Hassan et al 2006 submetido). O fato de que as crianças com linfoma de Hodgkin descritas no presente estudo apresentem idades maiores que as com linfoma de Burkitt da mesma instituição poderia refletir uma interação distinta do EBV com o sistema imune nas duas doenças ou a participação de outros fatores genéticos e ambientais, diferentes da idade de soroconversão.

Assim como no grupo alemão com a maior série de linfoma de Hodgkin pediátrico da literatura (Claviez et al, 2005), nós não encontramos associação do EBV com as características clínicas, estadiamento e grupo de risco. O mesmo sendo observado para o imunofenótipo, subtipo da esclerose nodular, número de células H-RS, padrão interfolicular e necrose. Os dados da literatura mostram que o EBV tem um papel importante na etiopatogênese do linfoma de Hodgkin, porém a sua relação tanto com as características clínicas, quanto com a composição do microambiente tumoral é controversa.

A oncogênese mediada pelo EBV se baseia na ação da sua principal proteína oncogênica, LMP1, que entre outras ações, ativa a expressão dos NF- κ B (Poppema et al, 2005). A LMP2A, que também é expressa pelas células H-RS infectadas pelo EBV, mimetiza o receptor de células B o que contribui para o resgate das células H-RS-precursoras com mutações deletérias dos genes da imunoglobulina as quais entrariam em apoptose. As células neoplásicas do linfoma de Hodgkin clássico possuem o NF- κ B constitutivamente ativado, funcionando como um importante sinal de sobrevivência para as células (Re et al, 2005). O número de mitoses em 10 CGA e o índice de proliferação celular foram avaliados para verificar se o EBV contribuiria com uma maior divisão celular, porém não se obteve

associação significativa. Isto reforça a idéia de que a contribuição do EBV é na etapa linfomagênica e na manutenção do estado transformado, não fornecendo vantagem proliferativa às células que o carregam em forma latente.

Alguns estudos têm pesquisado a relação entre o BAX, o p53 e o EBV (Brousset et al, 1996; Garcia et al, 2003), encontrando uma relação inversa entre a presença do EBV e a expressão de ambas as proteínas. Neste estudo, não obtivemos nenhum tipo de associação. O número de pacientes parece ser a explicação mais plausível para a ausência destas associações, uma vez que os linfomas de Hodgkin EBV-positivos têm caracteristicamente uma superexpressão de STAT1 e STAT3 pelas células H-RS e uma diminuição da expressão de p27, Hdm2, p53, ciclina E, CDK6 e Bcl-X_L (Garcia et al, 2003).

Neste estudo, foram utilizados métodos moleculares baseados em PCR para confirmação da infecção viral e para avaliação da frequência de marcadores polimórficos com possível influência biológica em isolados de EBV derivados de células tumorais e de controles não neoplásicos.

A busca por marcadores de oncogenicidade é um objetivo vigente nos cânceres associados ao EBV (Crawford, 2001). Dois subtipos distintos são conhecidos, EBV1 e EBV2, caracterizados por divergências de seqüência nos genes "EBV nuclear antigen 2 (EBNA2) e EBNA3 (Sample et al, 1990). Estes subtipos apresentam diferenças nas suas capacidades transformantes, sendo o tipo 2 o de menor poder de transformação (Rickinson et al, 2001). Isto permite entender a prevalência maior deste subtipo nas imunodeficiências e nas populações imunossuprimidas por fatores sócio-econômicos e sanitários (Hsu et al, 2000). É bastante estabelecido que a frequência dos subtipos EBV1 e 2 nos tumores

associados refletem a distribuição geográfica destes, mas do que propriedades oncogênicas das cepas virais.

Em nosso grupo, as frequências dos subtipos EBV1 e EBV2 foram similares aos encontrados nos CNN. Embora o pequeno grupo de CNN estudados, a frequência relativa de ambos subtipos não difere do reportado para os países ocidentais e para a América do Sul (Correa et al, 2004; Chabay et al, 2004). Ao contrário, nós achamos uma frequência significativamente maior da variante de LMP1 del30 nos linfomas (20/27, 74%) que nos CNN (3/11, 27%).

A proteína LMP1 é o principal oncogene viral, e é expresso nas células tumorais da maioria das neoplasias associadas ao EBV, incluindo o linfoma de Hodgkin, como relatado na literatura e encontrado também neste estudo. A região C-terminal do gene LMP1 influencia a proliferação, diferenciação e apoptose, pela sua interação com os receptores do fator de necrose tumoral (TRAFs) e os fatores de crescimento NF-kB (Knecht et al, 2001). Um número considerável de estudos tem focalizado na variante LMP1 del30, encontrados frequentemente nas condições neoplásicas mas também nas populações saudáveis (Knecht et al, 2001). Na América do Norte e Europa, a del30 é observada em 70% dos linfomas associados à SIDA, sendo sua presença significativamente menor nos portadores saudáveis do EBV (Berger et al, 1997; Dolcetti et al, 1997). Contrariamente, a del30 foi detectada em 20-30% dos linfomas de Hodgkin EBV+ em indivíduos Europeus imunocompetentes (Knecht et al, 1993; Sandvej et al, 2000). No linfoma de Hodgkin EBV+ na China, a frequência de del30 foi de 83%, mas foi também observado em 86% dos controles saudáveis (Zhou et al, 2001). Similar panorama foi observado no México, com 80% dos linfomas de Hodgkin e 59% dos controles saudáveis mostrando a del30 (Dirnhofer et al, 1999).

Uma alta frequência da del 30 foi relatada nos linfomas da América do Sul (Chabay et al, 2004; Chen et al, 1996; Hayashi et al, 1997). A variante del30 foi encontrada em somente 7.4% da população saudável da Argentina (Correa et al, 2004), enquanto foi descrita em cerca de 60% de controles reativos Brasileiros (Hayashi et al, 1997).

Assim, não é claro se a frequência da del30 nos cânceres associados ao EBV reflete meramente a predominância geográfica dessas variantes ou é devida a interações especiais vírus-hospedeiro levando a acumulação e/ou seleção positiva destas variantes no ambiente tumoral. Os resultados dos casos deste trabalho, assim como outros obtidos no laboratório com pacientes adultos com linfoma de Hodgkin (vide Anexo 3) sugerem um papel patogênico da variante LMP1 del30 no linfoma de Hodgkin desta região geográfica.

O papel prognóstico do EBV no linfoma de Hodgkin pediátrico é bastante controverso. Na literatura, só existem 3 estudos que avaliam o papel prognóstico do EBV, envolvendo apenas crianças. O maior deles, incluindo 842 crianças, mostrou que os casos positivos para LMP1 tinham uma pior sobrevida global (SG), porém sem impacto na sobrevida livre de doença (SLD) (Claviez et al, 2005). Este mesmo autor com uma série menor de casos (21 pacientes), não encontrou diferenças tanto na SG, quanto na SLD (Claviez et al, 1994). Já no estudo conduzido por Engel (47 pacientes), o EBV esteve associado a melhor SG e SLD (Engel et al, 2000). Na nossa série, não houve diferença na SLD e na SG entre os casos positivos e negativos para o EBV.

Num estudo americano envolvendo crianças e adultos, a associação com o EBV nos pacientes menores de 15 anos foi sugestiva de melhor SG e sobrevida doença-específica ($p= 0,07$) (Keegan et al, 2005). A SG não é a melhor forma de se

avaliar prognóstico no linfoma de Hodgkin clássico porque é afetada tanto pelas terapias de resgate após a recaída, quanto pelas mortes não relacionadas à doença ou secundárias ao tratamento (infecção neutropênica, toxicidade pulmonar secundária à bleomicina, cardiotoxicidade secundária à antraciclina, neoplasia secundária, etc). O mesmo acontece com a sobrevida doença-específica que é afetada pelo tratamento de resgate após a recaída e pode ser afetada pelos óbitos decorrentes da toxicidade terapêutica e, portanto, não reflete a agressividade biológica da doença. Desta forma, a sobrevida livre de doença, conforme definido neste estudo e denominada em muitos outros como sobrevida livre de falha (FFS, do inglês *failure-free survival*) é a melhor forma de se avaliar o comportamento biológico da neoplasia.

Como sugerido pela maior parte dos estudos na literatura, o EBV provavelmente não confere um efeito adverso em relação à resposta terapêutica nas crianças e adolescentes com linfoma de Hodgkin. Provavelmente, a instabilidade genética encontrada em praticamente todas as células H-RS (Re et al, 2002; Re et al, 2005), e não o EBV, seja a responsável pela resistência às drogas nos pacientes refratários e/ou recaídos.

Tabela 6.1: Prevalência do EBV no linfoma de Hodgkin pediátrico: principais séries de casos publicadas na literatura.

ESTUDO	PAÍS	IDADE		CM	EN	OTRS	TOTAL	%
		0-10	> 10					
Razzouk et al, 1997	EUA	13/17	2/9	12/17	2/6	1/3	15/26	58
Ambinder et al, 1993	EUA	4/7	5/18	6/7	2/15	1/3	9/25	36
Andriko et al, 1997	EUA	11/16	6/28	3/4	5/13	9/27	17/44	39
Keegan et al, 2005	EUA			6/6	6/22	4/8	16/36	44
Weinreb et al, 1992, 1996	UK	14/32	23/42	17/20	14/36	5/16	37/74	50
Armstrong et al, 1993	UK			7/7	2/2	0/1	13/22	59
Armstrong et al, 1998	UK	4/5	1/11				5/16	31
Khan et al, 1993	UK			2/4	4/19	0/1	6/24	25
Coates et al, 1993	UK						5/24	21
Brousset et al, 1993	França			6/8	1/3	0/2	7/13	54
Claviez et al, 1994	Alemanha	7/9	3/12	8/9	2/11	0/1	10/21	48
Claviez et al, 2005	Alemanha			131/190	122/549	5/13	263/842	31
Leoncini et al, 1996	Itália						3/9	33
Kanavaros et al, 1994	Grécia			8/11	4/10	0/1	12/22	55
Weinreb et al, 1996	Grécia			6/7	11/12	2/2	19/21	90
Chang et al, 1993	Peru	18/18	1/1	14/14	4/4	1/1	19/19	100
Ambinder et al, 1993	Honduras	8/8	3/3	6/6	3/3	2/2	11/11	100
Armstrong et al, 1993	Brasil			10/12	7/10	1/3	18/25	72
Razzouk et al, 1997	Brasil	14/19	1/7	10/17	3/6	2/3	15/26	58
Araújo et al, 2006	Brasil (BA)			50/50	25/30	3/7	78/90	86,7
Corrente estudo	Brasil (RJ)	10/16	21/49	23/53	7/8	1/3	31/64	48
Zarate-Osorno et al, 1995	México				1/1			100
Preciado et al, 1986, 1995	Argentina			19/25	0/9	3/7	22/41	54
De Matteo et al, 2003	Argentina			37/48	8/29	6/12	51/92	55
Monterroso et al, 1998	Costa Rica	1/1	2/2	1/1		2/2	3/3	100

OTRS: Outros; EUA: Estados Unidos da América; UK: Reino Unido; BA: Bahia; RJ: Rio de Janeiro.

Tabela 6.1: Prevalência do EBV no linfoma de Hodgkin pediátrico: principais séries de casos publicadas na literatura (continuação).

ESTUDO	PAÍS	IDADE		CM	EN	OTRS	TOTAL	%
		0-10	> 10					
Weinreb et al, 1996	Costa Rica			10/10	19/24	5/8	34/42	81
Zhou et al, 1993	China	3/3	1/1	3/3	1/1		4/4	100
Zhou et al, 2001	China	86/91	7/13	82/89	5/7	6/8	93/104	89
Chang et al, 2005	Vietnam			11/11	23/24	7/9	41/44	93
Chan et al, 1995	Hong Kong	2/2	2/3	2/2	2/2	0/1	4/5	80
Liu et al, 1998	Taiwan						4/6	67
Huh et al, 1996	Coréia			7/8	1/4	4/4	12/16	75
Hiraiwa et al, 1997	Japão	3/3				3/3	3/3	100
Kusuda et al, 1998	Japão	2/2	2/2	3/3	1/1		4/4	100
Peh et al, 1997	Malásia	9/10	5/5	8/9	6/6	0/9	14/15	93
Armstrong et al, 1993	AS			5/5	2/2	0/1	7/8	88
Weinreb et al, 1996	Jordânia			5/8	2/7	1/1	8/16	50
Weinreb et al, 1996	EA			¾	1/1	2/5	6/10	60
Weinreb et al, 1996	Irã						7/8	88
Benharroch et al, 1997	Israel						8/11	73
Weinreb et al, 1996a, b	Quênia			18/18	26/26	11/11	55/55	100
Leoncini et al, 1996	Quênia						41/42	98
Kusuda et al, 1998	Quênia	12/12	4/6	12/13	2/3	2/2	16/18	89
Weinreb et al, 1996	Egito			4/7	2/3	1/3	7/13	54
Weinreb et al, 1996	África S.			6/10	2/4	1/3	9/17	53
Weinreb et al, 1996	Austrália			3/3	8/11	0/1	11/15	73

OTRS: Outros; AS: Arábia Saudita; EA: Emirados Árabes; África S. África do Sul.

6.7 O linfoma de Hodgkin nas crianças pequenas (≤ 10 anos) é uma doença diferente?

A divisão dos pacientes em 2 grupos etários, tendo como ponto de corte a idade de 10 anos, mostrou associações que a princípio poderiam sugerir uma diferença biológica do linfoma de Hodgkin entre estes grupos etários.

Como mencionado, o subtipo histológico CM esteve mais associada às crianças com até 10 anos de idade, em consonância com a literatura. Os casos de menor idade estiveram também associados à esclerose nodular grau I, enquanto os pacientes com mais de 10 anos exibiram com maior frequência a esclerose nodular grau II. Conseqüentemente, foi observado um número menor de células H-RS (≤ 40 células H-RS em 10 CGA) no grupo de crianças com até 10 anos.

Características clínicas também apresentaram diferenças entre os grupos etários. As crianças com até 10 anos tiveram predomínio de estadios menores, ao contrário das mais velhas. O mesmo aconteceu quando a análise foi feita comparando os grupos de risco (doença favorável x desfavorável). Alguns estudos referem um maior percentual de estadios iniciais em crianças com até 16 anos nos países desenvolvidos; já nos países em desenvolvimento parece haver um predomínio de doença avançada nas crianças menores (Makepeace et al, 1987; Shankar et al, 1997; Stiller, 1998; Herbertson et al, 2005). O grupo turco publicou em 2005 um estudo no qual não encontrou diferenças nos estadiamentos entre os grupos de crianças mais novas e mais velhas (Oguz et al, 2005). Nossos resultados vão de encontro ao que é esperado para os países em desenvolvimento e, como mostrado pela regressão logística, há de fato uma tendência de associação entre estadios menores e idade de até 10 anos. Não houve diferença no tempo de

evolução da doença entre os 2 grupos etários, o que favorece a hipótese de diferença biológica do linfoma de Hodgkin entre crianças mais novas e mais velhas.

A presença da massa mediastinal teve distribuição semelhante ao estadiamento, ou seja, sua presença foi mais comum nos pacientes com mais de 10 anos. Este achado juntamente com àqueles do estadiamento poderiam refletir a idéia de uma maior “quantidade de doença” nas crianças com mais de 10 anos.

Alguns estudos mostram que os adolescentes têm um pior desfecho clínico quando comparado com as crianças (Albritton and Bleyer, 2003; Herbertson and Hancock, 2005) ou no mínimo semelhante ao dos adultos (Foltz et al, 2006). Estas diferenças poderiam ser secundárias a um distinto comportamento biológico da doença ou a discrepâncias entre os regimes terapêuticos oferecidos às crianças e aos adolescentes. Neste estudo, o tratamento foi semelhante nos 2 grupos etários, assim como o tempo de evolução da doença, o que nos faz pensar na possibilidade de uma real diferença biológica do linfoma.

6.8 Prognóstico e Sobrevida

A sobrevida das crianças com linfoma de Hodgkin tem aumentado com a introdução da poliquimioterapia antineoplásica e da radioterapia com campos envolvidos em baixas doses. A sobrevida livre de doença e a sobrevida global variam de 85% a 100% nos estádios iniciais. Nos estádios avançados, a cura é obtida em mais de 60% dos casos (Oguz et al, 2005). Entretanto, o prognóstico dos pacientes que recaem durante o tratamento inicial ou após a primeira remissão é bastante pobre (Lohri et al, 1991; Brice et al, 1996; Bonfante et al, 1997; Canellos et al, 1998; Vassilakopoulos et al, 1998; Josting et al, 2000). Aproximadamente 20% a 30% de todos os pacientes recaem e eventualmente morrem como resultado da

progressão da doença ou complicações da terapia antineoplásica (Hasenclever e Diehl, 1998). Por outro lado, uma fração de pacientes pode ser supertratada com protocolos quimioterápicos desnecessariamente agressivos. A identificação de fatores prognósticos facilita a definição de grupos de risco para a utilização de terapias adaptadas ao risco. A identificação de fatores prognósticos no linfoma de Hodgkin é um objetivo atual (Montalbán et al, 2004) uma vez que a utilização de critérios exclusivamente clínicos para a predição resposta irá falhar em um terço dos pacientes (Gobbi et al, 2001b; Zander et al, 2002).

Todos os regimes antineoplásicos utilizados nos pacientes deste estudo continham adriplastina e são considerados equivalentes quanto à resposta terapêutica final. A diferença entre eles reside principalmente nas complicações secundárias tardias (Donaldson e Link, 1987; Freyer et al, 1990; Oberlin et al, 1992; Hudson et al, 1993; Hunger, Link e Donaldson, 1994; Shankar et al, 1997; Weiner et al, 1997; Schellong et al, 1999). Assim, para as análises de sobrevida, todos os casos foram considerados como pertencentes a um mesmo protocolo de tratamento.

Sessenta pacientes tiveram os dados clínicos e informações de seguimento analisáveis. A sobrevida global foi de 94,7% e a sobrevida livre de doença foi de 87,5% o que não difere da literatura. Dos pacientes que foram ao óbito, a metade (2 casos) foi por progressão de doença. A sobrevida global mostrou uma tendência vantajosa para o grupo de pacientes com doença favorável em relação aos pacientes com doença desfavorável ($p= 0,08$). Isto se deve ao resgate de todos as recaídas com protocolos de segunda linha e/ou transplante de medula óssea. No grupo desfavorável, todas as crianças que recaíram morreram.

A repartição dos casos tanto pelo estadiamento, quanto pelo grupo de risco não foi capaz de predizer quais pacientes recairiam, uma vez que a distribuição

percentual destes casos entre os grupos foi semelhante: 43% eram do grupo favorável e 57% do grupo desfavorável. A ausência de significação estatística pode ter sido secundária ao tamanho da amostra. Porém, alguns estudos têm mostrado que os dados clínicos não são capazes de prever o prognóstico com segurança em pacientes com linfoma de Hodgkin. Por exemplo, o IPS (*International Prognostic Score*), falha em identificar com segurança os pacientes que irão responder favoravelmente ou desfavoravelmente ao tratamento (Montalbán et al, 2004). Embora seja adequado para muitos pacientes com doença avançada, sua efetividade prognóstica nas crianças com estadiamento precoce é muito controversa. Quase um terço dos pacientes com linfoma de Hodgkin tem o desfecho clínico avaliado erroneamente quando apenas dados clínicos são considerados (Gobbi et al, 2001a; Zander, Wiedenmann e Wolf, 2002).

A determinação do número de sítios acometidos pelo linfoma de Hodgkin como preditor da resposta terapêutica tem sido utilizada por alguns autores (Vassilakopoulos et al, 2001; Oguz et al, 2005). A justificativa é de que refletiria a carga tumoral total (Specht et al, 1988; Specht et al, 1989; Gobbi et al, 2001b). Neste estudo, o número de sítios acometidos esteve relacionado com o prognóstico. Os pacientes com mais de 5 sítios topográficos acometidos pelo linfoma de Hodgkin tiveram uma pior SLD ($p=0,03$). É possível que o número de sítios acometidos seja uma medida indireta do estadiamento e isto fica evidente quando se compara este número tanto com o estadiamento quanto com o grupo de risco da doença. Neste estudo, 85% dos pacientes com mais de 5 sítios acometidos eram dos estádios III e IV; quando a relação é feita com o grupo de risco, os resultados são mantidos (65% dos pacientes com mais de 5 sítios eram do grupo desfavorável). A utilização do número de sítios acometidos no linfoma de Hodgkin poderia levar ao mesmo

paradigma do emprego do estadiamento ou do IPS, fazendo com que um terço dos pacientes sejam avaliados erroneamente quanto ao prognóstico (Gobbi et al, 2001b; Zander, Wiedenmann e Wolf, 2002)? A inclusão de mais pacientes é fundamental para responder esta questão.

As variáveis histológicas e imunohistoquímicas utilizadas neste estudo foram avaliadas quanto à possibilidade de predição prognóstica. O número de células H-RS em 10 CGA mostrou importância prognóstica na análise inicial. No grupo de doença desfavorável, os pacientes com menos de 40 células em 10 CGA tiveram uma pior SLD em relação aos casos com mais células, 30% x 95%, respectivamente ($p= 0,004$). Os pacientes do grupo desfavorável com menor número de células H-RS tiveram maior frequência de casos do estadio IV (55,5%) o que poderia explicar a pior SLD neste grupo. Para o grupo favorável, não foi observada significação estatística. Não houve diferenças na sobrevida global em relação ao número de células neoplásicas.

O impacto prognóstico do grau da esclerose nodular é bem controverso na literatura. Alguns autores afirmam que o grau I teria um melhor prognóstico do que o grau II (Bennet et al, 1981, 1983; von Wasielewski et al, 2003), ao contrário de outros (van Spronsen et al, 1997). Histologicamente, o grau II possui não apenas um maior número de células H-RS, como também um maior número de anaplasia.

Neste estudo, ao contrário do exposto pela literatura, encontramos uma melhor SLD para os pacientes com esclerose nodular grau II ($p= 0,002$). Ao se estratificar os pacientes quanto ao grupo de risco, os com risco favorável tiveram uma tendência de associação do grau II com melhor SLD. Já os casos desfavoráveis que apresentavam o grau II, tiveram uma melhor SLD em relação ao grau I. Não houve diferenças em relação à sobrevida global.

Como mostrado anteriormente, embora não estatisticamente significativo, os casos de EN GII estiveram mais relacionados ao grupo de doença desfavorável, recebendo tratamento mais intensivo (terapia risco-adaptada) do que aqueles do grupo de doença favorável (mais associados à EN GI). Como mostrado nos resultados, a relação entre o grau da esclerose e a recaída mostrou que os pacientes com EN GII não recaíram, ao contrário das crianças com EN GI, explicando a melhor SLD para os casos de esclerose nodular grau II em relação ao grau I.

A significância prognóstica do CD20 é controversa. O grupo do Memorial Sloan-Kettering mostrou que em adultos os casos de linfoma de Hodgkin CD20 positivos estiveram associados a um pior prognóstico (Donnelly et al, 1999), assim como em outro estudo onde casos CD20 positivos / CD30 e CD15 negativos apresentaram pior SLD e SG (von Wasielewski et al, 1997b). Outros estudos mostraram falta de associação entre a imunoexpressão do CD20 e o prognóstico (Rassidakis et al, 2002a; Tzankov et al, 2003b). Há estudos que mostram um melhor prognóstico para os casos que imunoexpressam o CD20 (Tzankov et al, 2003a). Segundo os autores, este resultado seria consequência da semelhança entre o CD20 e um canal de Ca^{2+} pelo que as células H-RS teriam uma maior permeabilidade às drogas antineoplásicas (Dilman, 2001). O CD20 poderia inibir ainda alguns dos efeitos da interleucina 4, um potente fator de crescimento autócrino das células H-RS (Newcom, Muth e Ansari, 1992).

Os estudos em pediatria são escassos. Assim como a maioria dos autores, nós não encontramos diferenças na SLD e SG entre os casos CD20 positivos e negativos, nem mesmo quando foram estratificados por grupos de risco

da doença. É provável que o tratamento antineoplásico utilizado na população pediátrica seja eficiente de tal maneira a inibir as “ações” negativas desta proteína.

Alguns estudos têm referido a imunexpressão do CD15 como fator prognóstico no linfoma de Hodgkin (Re et al, 2005). von Wasielewski e colaboradores observaram num estudo com 1751 casos de linfoma de Hodgkin que a ausência do CD15 estava relacionada a um maior número de recaídas e a pior sobrevida global (von Wasielewski et al, 1997b). Por outro lado, Petrella et al mostraram em sua série de casos um melhor prognóstico para os casos CD15 positivos. Nós não encontramos diferença na SLD e na SG em relação à presença ou ausência do CD15, em concordância com a quase totalidade da literatura consultada. Isto sugere que o CD15 seja apenas um marcador aberrante das células H-RS, assim como Pax-5, MUM-1, CD138, CD30, fascinina e TARC.

O índice de proliferação celular definido pela imunexpressão do Ki-67 tem sido investigado em diversas neoplasias, inclusive com definição prognóstica (Gerdes, 1990; Brown e Gatter, 1990). No linfoma de Hodgkin, os diversos pontos de corte na consideração de positividade deste marcador dificulta a análise comparativa (Morente et al, 1997; Garcia et al, 2003; Sánchez-Aguilera et al, 2006). Morente e colaboradores observaram uma pior sobrevida global para os casos com Ki-67 > 19,9% (Morente et al, 1997). Já o grupo espanhol não encontrou qualquer relação do prognóstico com o índice de proliferação celular (Montálban et al, 2004; Sánchez-Aguilera et al, 2006).

Neste estudo nós utilizamos como ponto de corte o percentual de 51%. Os casos com percentual menor foram considerados como baixo índice de proliferação celular. Foi observada, no grupo de doença desfavorável, uma melhor sobrevida livre de doença para os casos que expressaram Ki-67 em 51% ou mais de

células H-RS ($p= 0,05$). Não houve diferenças na SLD no grupo de doença favorável. A sobrevida global foi a mesma para ambos os grupos definidos a partir do Ki-67. Talvez, no grupo de doença desfavorável, o linfoma de Hodgkin com alta imunoexpressão de Ki-67 represente de fato uma doença em que há uma grande divisão das células neoplásicas e, portanto, mais responsiva ao regime poliquimioterápico. Como as drogas antineoplásicas atuam nas células que entram em divisão celular, ou seja, saem de G0, é esperado que quanto maior a fração de células em mitose, maior seja a sensibilidade aos quimioterápicos (Balis et al, 1997). Além disso, como mostrado anteriormente, os casos com menor índice de proliferação celular estiveram associados a maior número de células H-RS em 10 CGA, ao contrário dos casos com imunoexpressão do Ki-67 $\geq 51\%$ das células neoplásicas que estiveram relacionados a um menor número de células H-RS ($p= 0,01$). A melhor SLD no grupo de doença desfavorável dos casos com maior índice de proliferação celular poderia então ser explicada pelo fato de se ter um menor número de células neoplásicas para ser destruído e um maior percentual de células fora da intérfase, favorecendo a ação dos agentes quimioterápicos.

Com a regressão de Cox, o número de sítios acometidos pela doença continuou relacionado a SLD, indicando que quanto maior o número de sítios, pior a SLD. Resultado semelhante foi encontrado por Vassilakopoulos et al (2001). O número de células neoplásicas mostrou tendência de associação com a SLD, enquanto as outras variáveis perderam significação. O tratamento antineoplásico empregado no linfoma de Hodgkin, combinando vários agentes quimioterápicos com ou sem a radioterapia, é capaz de reduzir o impacto da maioria dos fatores prognósticos o que poderia então explicar a perda de significância das referidas variáveis.

7- CONCLUSÕES

Este estudo incluiu todos os pacientes pediátricos (0-18 anos) com linfoma de Hodgkin diagnosticados no INCA entre 1999-2003, 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 perfil clínico, histológico e epidemiológico é notoriamente diferente do observado em outro estudo realizado no Nordeste do Brasil.

A esclerose nodular grau II foi mais prevalente do que o descrito na literatura, provavelmente como reflexo da biologia da doença e não consequência ao intervalo de tempo entre o início dos sinais/sintomas e o diagnóstico.

Não houve diferença na categorização do número de células H-RS e no infiltrado eosinofílico tumoral entre os grupos estudados. A esclerose nodular mostrou tendência de associação com um maior número de células neoplásicas e um menor índice mitótico. Coube à esclerose nodular grau II o maior índice mitótico (88% destes casos).

Este é o primeiro estudo pediátrico que leva em consideração o número de mitoses na categorização do linfoma de Hodgkin. Houve predomínio de pacientes com baixo índice mitótico. Porém, o percentual de casos com mais de 10 mitoses em 10 CGA foi duas vezes maior ao encontrado no único trabalho existente na literatura.

A imunexpressão do CD30, CD15 e CD20 não diferiu do que é publicado na literatura.

A utilização do TMA na análise de um grande número de casos de linfoma de Hodgkin, mesmo esta neoplasia tendo um pequeno número de células neoplásicas, é eficaz, sobretudo quando se utilizam dois cilindros ao invés de um, aumentando o número total de casos analisáveis.

A freqüência de associação com o EBV foi de 48%, similar ao observado em estudos na Argentina e inferior ao esperado para os casos pediátricos dos países em desenvolvimento, incluindo os resultados observados na Bahia, sendo a diferença no status sócio-econômico a principal hipótese para estas divergências. Porém, semelhante à literatura, as crianças com até 10 anos foram as mais associadas ao vírus. Foi observada uma maior associação da esclerose nodular com o EBV e uma tendência de associação do vírus com a celularidade mista. Estes resultados são secundários a maior prevalência da esclerose nodular. Não foi encontrada associação do EBV com nenhuma das características clínicas e histológicas, nem com as sobrevidas global e livre de doença.

Os estudos moleculares sobre o gene LMP1 do EBV apontam para um papel patogênico de variantes deletionadas no linfoma de Hodgkin nesta região geográfica, apoiando a hipótese do envolvimento do vírus mais com os eventos linfomagênicos do que com as características clínico-biológicas da doença.

Os dados de associação entre variáveis histológicas (infiltrado eosinofílico, número de células neoplásicas, etc) e clínico-laboratoriais (massa mediastinal, sintomas B, leucometria, etc) sugerem que a composição do microambiente tumoral e, conseqüentemente, a expressão de citocinas no tumor, tem papel nas características clínicas da doença, hipótese suscetível de ser avaliada em estudos futuros.

Os resultados obtidos neste estudo, apontam para uma possível diferença biológica do linfoma de Hodgkin entre o grupo de crianças com até 10 anos e o grupo de crianças mais velhas. Hipótese esta sustentada pelas diferenças encontradas: predomínio da celularidade mista, prevalência do grau I na esclerose nodular, menor número de células H-RS, estadiamento menor, grupo de doença favorável e ausência de massa mediastinal nos pacientes mais novos. Já as crianças mais velhas e adolescentes exibiram com maior freqüência esclerose nodular, grau II na esclerose, maior número de células H-RS, estadiamento maior, grupo de doença desfavorável e massa mediastinal. O aumento desta série de casos é crucial para que se consigam resultados definitivos em relação a esta questão.

Neste estudo, a sobrevida livre de doença e a sobrevida global foram semelhantes àquelas da literatura, com uma tendência de melhor sobrevida global para as crianças do grupo de doença favorável. O status de seguimento também foi análogo ao da literatura. As características clínicas foram incapazes de predizer o desfecho clínico dos pacientes.

Nos pacientes deste estudo, o número de sítios acometidos pela doença teve impacto prognóstico confirmado. Por sua vez, o número de células neoplásicas em 10 CGA, o grau II da esclerose nodular e o índice de proliferação celular apresentaram impacto na sobrevida livre de doença somente na análise univariada. A ampliação do número de casos é essencial para que se tenham conclusões definitivas em relação ao valor prognóstico destas variáveis. A imunoposição do CD20 e a negatividade do CD15 não apresentaram impacto na sobrevida livre de doença e na sobrevida global.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGNARSSON, B. A.; KADIN, M. E. The immunophenotype of Reed-Sternberg cells. A study of 50 cases of Hodgkin's disease using fixed frozen tissues. **Cancer**, v.63, p.2083-2087, 1989.
2. ALBRITTON, K; BLEYER, W. The management of cancer in the older adolescent. **Eur J Cancer**, v.39, p.2584-2599, 2003.
3. ALVARO, T. et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. **Clin Cancer Res**, v.11, p.467-473, 2005.
4. AMBINDER, R. F. et al. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. **Blood**, v.81, p.1642-1647, 1993.
5. ANDRIKO, J.A. et al. Childhood Hodgkin's disease in the United States : an analysis of histologic subtypes and association with Epstein-Barr virus. **Mod Pathol**, v.10. p.366-371, 1997.
6. ARAUJO, I. et al. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. **Virchows Arch**, v.449, n.3, p.315-319, 2006.
7. ARMSTRONG, A. A. et al. Association of Epstein-Barr with pediatric Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, v.142, p.1683-1688, 1993.
8. ARMSTRONG, A. A. et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. **Leukemia**, v.12, p.1272-1276, 1998.
9. AXDORPH, U. et al. Tissue eosinophilia in relation to immunopathological and clinical characteristics in Hodgkin's disease. **Leuk Lymphoma**, v.42, n.5, p.1055-1065, 2001.
10. AZZOLA, M. F. et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. **Cancer**, v.97, p.1488-1498, 2003.
11. BALIS, F. M.; HOLCENBERG, J. S.; POPLACK, D. G. General principles of chemotherapy. In: PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. New York: Lippincott-Raven, 1997. p.215-272.

12. BARROS, M. H. M. et al. Experiência de 5 anos do Programa de Avaliação dos Curados com os efeitos adversos tardios em curados de linfoma de Hodgkin da infância. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica**. Belo Horizonte, p.20, 2002.
13. BARROS, M. H. M. et al. Late effects in Brazil: experience of the Cured Evaluation Program. **Med Pediatr Oncol**, v.41, n.4, p.361, 2003.
14. BELKAID, M. I. et al. Comparasion of Epstein-Barr virus markers in Reed-Sternberg cell in adult Hodgkin's disease tissues from an industrialized and a developing contry. **Leuk Lymphoma**, v.17, p.163-168, 1995.
15. BELLAMY, C. O. C. p53 and apoptosis. **Br Med Bull**, v.53, p.522-538, 1996.
16. BELLING, O. et al. Comparative analysis of various standard immunohistochemical procedures. **Pathologe**, v.20, n.4, p.242-250, 1999.
17. BENETT, M. H. et al. Analysis of grade 1 Hodgkin's disease (report no. 6). **Clinical Radiology**, v.32, p.491-498, 1981.
18. BENETT, M. H. et al. The prognostic significance of cellular subtypes in nodular esclerosing Hodgkin's disease: an analysis of 271 non-laparotomised cases (BNLI report n^o. 22). **Clin Radiol**, v.34, p.497-501, 1983.
19. BENHARROCH, D. et al. Association of the Epstein-Barr virus with Hodgkin's disease in Southern Israel. **Int J Cancer**, v.71, p.138-141, 1997.
20. BERGER, C. et al. Deletion variants within the NF-kB activation domain of the LMP1 oncogene in acquired immunodeficiency syndrome-related large cell lymphomas, in prelymphomas and atypical lymphoproliferations. **Leuk. Lymphoma** v.26, p.239-250, 1997.
21. BHATIA, S. et al. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. **N Engl J Med**, v.334, p.745-751, 1996.
22. BIERMAN, P. J. et al. The International Prognostic Factors Project score for advanced Hodgkin's disease is useful for predicting outcome of autologous hematopoietic stem cells transplantation. **Ann Oncol**, v.13, p.1370-1377, 2002.
23. BLAZAR, B. R. et al. CD30/CD30 ligand (CD153) interaction regulates CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease. **J Immunol**, v.173, n.5, p.2933-2941, 2004.
24. BLOOM, M. J. C.; RICHARDSON, W.W. Histologic grading and prognosis in breast cancer. A study of 1709 cases. **Br J Cancer**, v.11, p.359-377, 1957.

25. BONFANTE, V. et al. Outcome of patients with Hodgkin's disease failing after primary MOPP-ABVD. **J Clin Oncol**, v.15, p.528-534, 1997.
26. BRICE, P. et al. Analysis of prognostic factors after the first relapse of Hodgkin's disease in 187 patients. **Cancer**, v.78, p.1293-1299, 1996.
27. BRINK, A. A. 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**, v.11, p.376-383, 1998.
28. BRINK, A. A. et al. Multiprimed cDNA synthesis followed by PCR is the most suitable method for Epstein-Barr virus transcrip analysis in small lymphoma biopsies. **Molecular Cell Probes**, v.11, p.39-47, 1997.
29. BROUSSET, P. et al. Frequent expression of the cell death-inducing gene Bax in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Blood**, v.87, p.2470-2475, 1996.
30. BROUSSET, P. 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**, v.23, p.189-191, 1993.
31. BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopatology. **Histopathology**, v.17, p.489-503, 1990.
32. BRUNIERA, P. et al. Protocolo do Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento do Linfoma de Hodgkin da Infância e Adolescência. **Apresentação do Protocolo** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <ciop2.sobope@uol.com.br> em 14 jul. 2006.
33. BUBENDORF, L. et al. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol**, v.195, n.1, p.72-79, 2001.
34. BUTTLER, J. J.; PUGH, W. C. Review of Hodgkin's disease. **Hematol Pathol**, v.7, p.59-77, 1993.
35. BUYUKPAMUKÇU, M. et al. Hodgkin's disease in Turkish children. Clinical characteristics and treatment results of 210 patients. **Pediatric Hematol Oncol**, v.16, p.119-129, 1999.
36. CAMP, R. L.; CHARETTE, L. A.; RIMM, D. L. Validation of tissue microarray technology in breast cancer. **Lab Invest**, v.80, n.12, p.1943-1949, 2000.
37. CANELLOS, G. P. et al. Treatment of relapse Hodgkin's disease : Strategies and prognostic factors. **Ann Oncol**, v.9, p.91-96, 1998.

38. CARBONE, P. T. et al. Symposium (Ann Arbor): Staging in Hodgkin's disease. **Cancer Res**, v.31, p.1707, 1971.
39. CARSON, F. L. **Histotechnology**: a self-instructional text. 2.ed. Hong Kong: American Society of Clinical Pathologists, 1996. 304 p.
40. CHABAY, P. et al. High frequency of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 30 bp deletion in a series of pediatric malignancies in Argentine. **Arch Virol**, v.149, p.1515-1526, 2004.
41. CHAN, J. K. C. et al. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease occurring in an oriental population. **Hum Pathol**, v.26, p.314-318, 1995.
42. CHANG, K. C. et al. Epstein-Barr virus is associated with all histological subtypes of Hodgkin lymphoma in Vietnamese children with special emphasis on the entity of lymphocyte predominance subtype. **Hum Pathol**, v.36, p.747-755, 2005.
43. CHANG, K. L. et al. High prevalence of Epstein-Barr in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. **Blood**, v.81, p.496-501, 1993.
44. CHEN, W. G. et al. Genotyping of Epstein-Barr virus in Brazilian Burkitt's lymphoma and reactive lymphoid tissue. Type A with a high prevalence of deletions within the latent membrane protein gene. **Am J Pathol** v.148, p.17-23, 1996.
45. CHITTAL, S. M. et al. Monoclonal antibodies in the diagnosis of Hodgkin's disease. The search for a rational panel. **Am J Surg Pathol**, v.12, p.9-21, 1988.
46. CLARKE, C. A. et al. Epstein-Barr virus and survival after Hodgkin disease in a population-based series of women. **Cancer**, v. 91, p.1579-1587, 2001.
47. CLAVIEZ, A. et al. The impact of EBV, proliferation rate, and Bcl-2 expression in Hodgkin's disease in childhood. **Ann Hematol**, v.68, p.61-66, 1994.
48. CLAVIEZ, A. et al. Impact of latent Epstein-Barr virus infection on outcome in children and adolescents with Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, v.23, n.18, p.4048-4056, 2005.
49. COATES, P. J. et al. Detection of Epstein-Barr virus in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease arising in children. **Med Pediatr Oncol**, v.21, p.19-23, 1993.
50. COINDRE, J. M. et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas : a study of 1240

- patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **Cancer**, v.91, p.1914-1926, 2001.
51. COLBY, T. V.; HOPPE, R. T.; WARNKE, R. A. Hodgkin's disease: a clinicopathologic study of 659 cases. **Cancer**, v.49, n.9, p.1848-1858, 1982.
 52. COLOMO, L. et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v.34, n.1, p.78-84, 2003.
 53. CORREA, M. et al. Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. **J Med Virol** v.73, p.583-588, 2004.
 54. CORREA, P.; O'CONNOR, G. T. Epidemiologic pattern of Hodgkin's disease. **Int J Cancer**, v.8, p.192-201, 1971.
 55. COSTA, J. et al. The grading of soft tissue sarcomas. Results of clinicopathologic correlation in a series of 163 cases. **Cancer**, v.53, p.530-541, 1984.
 56. CRAWFORD, D. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. **Phil Trans Soc Lond**, v.356, p.461-473, 2001.
 57. DE MATTEO, E. et al. Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult argentine patients. **Arch Pathol Lab Med**, v.127, p.1325-1329, 2003.
 58. DILMAN, R. O. et al. Monoclonal antibody therapy for lymphoma. **Cancer Pract**, v.9, p.71-80, 2001.
 59. DIRNHOFER, S. et al. High prevalence of a 30-base pair deletion in the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 gene and of strain type B EBV in Mexican classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue. **Hum Pathol** v.30, p.781-787, 1999.
 60. DOGGETT, R. S.; COLBY, T. V.; DORFMAN, R. F. Interfollicular Hodgkin's disease. **Am J Surg Pathol**, v.7, p.145-149, 1983.
 61. DOLCETTI, R. et al. Epstein-Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the Italian population and high association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease. **Blood** v.89, p.1723-1731, 1997.
 62. DONALDSON, S. S., KAPLAN, H. S. Complications of treatment of Hodgkin's disease in children. **Cancer Treatment Reports**, v. 66, p.977-989, 1982.

63. DONALDSON, S. S.; LINK, M. P. Combined modality treatment with low-dose radiation and MOPP chemotherapy for children with Hodgkin's disease. **J Clin Oncol**, v.5, p.742-749, 1987.
64. DONNELLY, G. B. et al. Increased treatment failure in patients with CD20 positive classic Hodgkin's disease (HD). **Blood**, v. 94, p. 598a, 1999.
65. ELGUI DE OLIVEIRA, D. 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 Patol**, v.118, n.1, p.25-30, 2002.
66. ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histologic grades in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v.19, p.403-410, 1991.
67. ENGEL, M. et al. Improved prognosis of Epstein-Barr virus associated childhood Hodgkin's lymphoma: study of 47 South African cases. **J Clin Pathol**, v.53, p.182-186, 2000.
68. ERTEM, U. et al. Hodgkin's disease in 82 Turkish children diagnosed over 10-year period. **Pediatric Hematol Oncol**, v.14, p.359-366, 1997.
69. EVANS, A. S.; GUTENSOHN, N. M. A population-based case-control study of EBV and other viral antibodies among persons with Hodgkin's disease and their sibilings. **Int J Cancer**, v.34, p.149-157, 1984.
70. FARIA, S. L. et al. Childhood Hodgkin's disease in Campinas, Brazil. **Med Pediatr Oncol**, v.26, n.2, p.90-94, 1996.
71. FELBAUM, C. et al. Influence of Epstein-Barr virus genomes on patient survival in Hodgkin's disease. **Am J Clin Pathol**, v. 98, p.319-323, 1992.
72. FERRY, J. A. et al. Hodgkin's disease, nodular sclerosis type: implications of histologic subclassification. **Cancer**, v.71, p.457-463.
73. FIGUEIRA-SILVA, C. M.; PEREIRA, F. E. L. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória, State of Espírito Santo, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** v.37, p.409-412, 2004.
74. FLAVELL, K. J. Variation in the frequency of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease with age. **Leukemia**, v.14, p.748-753, 2000.
75. FOLTZ, L.; SONG, K. W.; CONNORS, J. M. Hodgkin's lymphoma in adolescents. **J Clin Oncol**, v.24, n.16, p.2520-2526, 2006.

76. FRYER, C. J. 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** v.8, p.1971-1980, 1990.
77. GAN, Y. J.; et al. A defective, rearranged Epstein-Barr virus genome in EBER-negative and EBER-positive Hodgkin's disease. **Am J Pathol.** v.160, p.781-786, 2002.
78. GANDHI, M. K. et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. **Br J Haematol**, v.125, p.267-281, 2004.
79. GARCÍA, J. F.; et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. **Blood**, v.101, n.2, p.681-689, 2003.
80. GERDES, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluation in human malignancies. **Semin Cancer Biol**, v.1, p.199-206, 1990.
81. GISSELBRECHT, C. et al. How to define intermediate stage in Hodgkin's lymphoma? **Eur J Haematol**, v.75, s.66, p.111-114, 2005.
82. GLASER, S. et al. EBV associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. **Int J Cancer**, v.70, p.375-382, 1997.
83. GLIMELIUS, I. et al. IL-9 expression contributes to the cellular composition in Hodgkin's lymphoma. **Eur J Haematol**, v.76, p.278-283, 2006.
84. GOBBI, P. G. et al. Comparasion of prognostic models in patients with advanced Hodgkin disease: Promising results from integration of the best three systems. **Cancer**, v.91, p.1467-1478, 2001b.
85. GOBBI, P. G. et al. Image-aided estimate of tumor burden in Hodgkin's disease: evidence of its primary prognostic importance. **J Clin Oncol**, v.19, p.1388-1394, 2001a.
86. GRIFFIN, M. C.; ROBINSON, R. A.; TRASK, D. K. Validation of tissue microarray using p53 immunohistochemical studies of squamous cell carcinoma of the larynx. **Mod Pathol**, v.16, n.12, p.1181-1188, 2003.
87. GRUFFERMAN, S. L.; DELZELL, E. Epidemiology of Hodgkin's disease. **Epidemiol Rev**, v.6, p.76-106, 1984.
88. GULLEY, M. L. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. **J Mol Diagn**, v.3, p.1-10, 2001.

89. GUTENSOHN, N; COLE, P. Epidemiology of Hodgkin's disease. **Semin Oncol**, v.7, p.92-102, 1980.
90. HAMMERSCHMIDT, W.; SUGDEN, B. Epstein-Barr virus sustains Burkitt's lymphomas and Hodgkin's disease. **Trends Mol Med**, v.10, n.7, p.331-336, 2004.
91. HANAMOTO, 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**, v.164, p.997-1006, 2004.
92. HARRIS, N. The many faces of Hodgkin's disease around the world: what have we learned from its pathology? **Ann Oncol**, v. 9, p.45-56, 1998.
93. HASENCLEVER, D.; DIEHL, V. A prognostic score to advanced Hodgkin's disease: International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. **N Engl J Med**, v.339, p.1506-1514, 1998.
94. HASSAN, R. et al. Epstein-Barr Virus (EBV) detection and typing by PCR: A contribution to diagnosis and management of EBV-positive Burkitt's lymphoma. **Diagn Pathol**, v.1, p.17-22, 2006.
95. HAYASHI, K. et al. Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in United States and Brazilian Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue: high frequency of a 30-bp deletion. **Hum Pathol** 28:1408-1414, 1997.
96. HAYBITTLE, J. L. et al. Review of British National Lymphoma Investigation studies of Hodgkin's disease and development of prognostic index. **Lancet**, p.967-972, 1985.
97. HEDVAT, C. et al. Applications of tissue microarray technology to the study of non-Hodgkin and Hodgkin's lymphoma. **Human Pathol**, v.33, n.10, p.968-974, 2002.
98. HENLE, G. et al. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and controls. **J Natl Cancer Inst**, v.43, p.1147-1157, 1969.
99. HERBERTSON, R.; HANCOCK, B.W. Hodgkin lymphoma in adolescents. **Cancer Treatment Reviews**, v.31, p.339-360, 2005.
100. HERBST, H. et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed Sternberg cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.4766-4770, 1991.
101. HINZ, M. et al. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin lymphoma tumor cells, pathogenetic significance, and link to

- constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. **J Exp Med**, v.196, p.605-617, 2002.
102. HIRAIWA, H. et al. Epstein-Barr virus infection, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, and reactive follicular hyperplasia in Japanese children : evaluation of paraffin-embedded specimens using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. **Acta Pediatr Jpn**, v.39, p.158-165, 1997.
 103. HOWE, J.; STEITZ, J. Localization of Epstein-Barr virus encoded small RNAs by in situ hybridization. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, p.9006-9010, 1986.
 104. HSU, J.; GLASER, S. Epstein Barr virus – associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. **Clin Rev Hematol Oncol**, v.34, p.27-53, 2000.
 105. HSU, S.M.; JAFFE, E. S. LeuM1 and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's disease. **Am J Clin Pathol**, v.82, p.29-32, 1984.
 106. HUDSON, M. M. et al. Efficacy and toxicity of multiagent chemotherapy and low-dose involved-field radiotherapy in children and adolescents with Hodgkin's disease. **J Clin Oncol**, v.11, p.100-108, 1993.
 107. HUH, J. et al. A pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with Epstein-Barr virus infection. **Cancer**, v.77, p.949-955, 1996.
 108. HUNGER, S. P.; LINK, M. P.; DONALDSON, S. S. ABVD/MOPP and low-dose involved-field radiotherapy in pediatric Hodgkin's disease: the Stanford experience. **J Clin Oncol**, v.12, p.2160–2166, 1994.
 109. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Síntese de Indicadores Sociais 2006**. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicador_esminimos/sinteseindicisociais2006/indic_sociais2006.pdf. Acesso em> 06 janeiro 2007.
 110. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v.70, p.47-373, 1997.
 111. JAFFE, E. S. et al. **World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues**. 2. ed. Lyon: IARC Press, 2001. 244p.

112. JARRETT, R. F. et al. The Scotland and Newcastle epidemiological study of Hodgkin's disease: impact of histopathological review and EBV status on incidence estimates. **J Clin Pathol**, v.56, p.811-816, 2003.
113. JARRETT, R. F. Viruses and Hodgkin's lymphoma. **Annals of Oncology**, s.1, p.23-29, 2002.
114. JOSTING, A. et al. Prognostic factors and treatment outcome in primary progressive Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group. **Blood**, v.96, p.1280-1286.
115. JUNDT, F. et al. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. **Blood**, v.94, p.2065-2071, 1999.
116. KADIN, M. E.; GLATSTEIN, E.; DORFMAN, R. F. Clinicopathologic studies of 117 untreated patients subjected to laparotomy for the staging of Hodgkin's disease. **Cancer**, v.27, p.1277-1294, 1971.
117. KADIN, M.E.; LIEBOWITZ, D. N. Cytokine and cytokine receptors in Hodgkin's disease. In: MAUCH, P. M. et al. **Hodgkin's Disease**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:139–157.
118. KAMEL, O. et al. Clonal VDJ recombination of the immunoglobulin heavy chain gene by PCR in classical Hodgkin's disease. **Am J Clin Pathol**, v.104, p.419-423, 1995.
119. KAMMERER, U. et al. A new rapid immunohistochemical staining technique using the EnVision antibody complex. **J Histochem Cytochem**, v.49, n.5, p.623-630, 2001.
120. KANAVAROS, P. et al. Expression of p53, p21/waf1, Bcl-2, bax, Rb, Ki67 proteins in Hodgkin's lymphomas. **Histol Histopathol**, v.15, p.445-453, 2000.
121. KANAVAROS, P. et al. Frequent detection of Epstein-Barr virus (EBV), EBER transcripts and latent membrane protein-1 (LMP-1) in tumour cells in Hodgkin's disease arising in childhood. **Pathol Res Pract**, v.190, p.1026-1030, 1994.
122. KANZLER, H. et al. 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**, v.184, p.1495-1505, 1996.

123. KEEGAN, T. H. M. et al. Epstein-Barr virus as a marker of survival after Hodgkin's lymphoma: a population-based study. **J Clin Oncol**, v.23, n.30, p.7604-7613, 2005.
124. KHAN, G.; NORTON, A. J.; SLAVIN, G. Epstein-Barr virus in Hodgkin disease. Relation to age and subtype. **Cancer**, v.71, p.3124-3129, 1993.
125. KIM, L. H. et al. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. **Histopathology**, v.44, p.257-267, 2004.
126. KIM, L. H.; PEH, S. C; POPPEMA, S. Expression of retinoblastoma proteins in classical Hodgkin lymphoma: relationship with expression of p53 and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death. **Mod Pathol**, v.37, p.92-100, 2006.
127. KLUMB, C. E. et al. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. **Int J Cancer**, v.108, p.66-70, 2004.
128. KNECHT, H. et al. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. **Blood** v.82, p.2937-2942. 1993.
129. KNECHT, H. et al. The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. **Oncology** v.60, p.289-302, 2001.
130. KONONEN, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**, v.4, n.7, p.844-847, 1998.
131. KUPPERS, R. et al. Biology of Hodgkin's lymphoma. **Ann Oncol**, v.13, s.1, p.11-18, 2002.
132. KUPPERS, R.; RAJEWSKY, K. The origin of Hodgkin and Reed/ Sternberg cells in Hodgkin's disease. **Ann Rev Immunol**, v.16, p.471-493, 1998.
133. KUSUDA, M. 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**, v.59, p.801-807, 1998.
134. LAM, N.; SUGDEN, B. CD40 and its viral mimic, LMP-1 : similar means to different ends. **Cell Signal**, v.15, p.9-16, 2002.
135. LAURITZEN, A. F. et al. Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin's disease. **APMIS**, v.107, n.7, p.636-644, 1999.
136. LEIGHT, E. R.; SUGDEN, B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. **Rev Med Virol**, v.10, p.83-100, 2000.

137. LEONCINI, L. et al. Neoplastic cells of Hodgkin's disease show differences in EBV expression between Kenya and Italy. **Int J Cancer**, v.65, p.781-784, 1996.
138. LEVERSHA, M. et al. Expression of p53, pRB and p16 in lung tumors: a validation study on tissue microarray. **J Pathol**, v.200, n.5, p.610-619, 2003.
139. LIU, S. M. et al. Expression of Epstein-Barr virus in patients with Hodgkin's disease in Taiwan. **Cancer**, v.83, p.367-371, 1998.
140. LOHRI, A. et al. Outcome of treatment of first relapse of Hodgkin's disease after primary chemotherapy: Identification of risk factors from the British Columbia experience 1970-88. **Blood**, v.77, p.2292-2298, 1991.
141. LOUREIRO, M.M. 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** v.40, p.37-40, 2004.
142. LUKES R. J. Criteria for involvement of lymph node, bone marrow, spleen, and liver's in Hodgkin's disease. **Cancer Res**, v.31, p.1755-1767, 1971.
143. LUKES, R. J.; BUTLER, J. J. HICKS, E. B. Natural history of of Hodgkin's disease as related to its pathologic picture. **Cancer**, v.19, p. 317-344, 1966.
144. LUKES, R. J.; BUTLER, J. J. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer Res**, v.26, p.1063-1081, 1966.
145. MACLENNAN, K. A. et al. Diagnosis and grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 2190 patients. **Int Ver Exp Pathol**, v.33, p.2751, 1992.
146. MACLENNAN, K. A. et al. Relationship of histopathologic features to survival and relapse in nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 1659 patients. **Cancer**, v.64, p.1686-1693, 1989.
147. MACON, W. R. et al. T-cell-rich-B-cell lymphomas : a clinicopathologic study of 19 cases. **Am J Surg Pathol**, v.16, p.351-363, 1992.
148. MAGGIO, E. M. et al. TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. **Int J Cancer**, v.94, p.60-66, 2001.
149. MAKEPEACE, A. R. et al. Hodgkin's disease in childhood: the British National Lymphoma investigation experience (BNLI report No 27). **Clin Radiol**, v.38, p.7-11, 1987.

150. MEYER, R.; AMBINDER, R. F.; STROOBANTS, S. Hodgkin's lymphoma: involving concepts with implications practice. **Hematology**, v.1, p.184-202, 2004.
151. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Publicações. **Portarias**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sas/legislacao.php>> . Acesso em: 06 janeiro 2007.
152. MONTALBÁN, C. 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**, v.22, n.9, p.1664-1673, 2004.
153. MONTERROSO, V. et al. Hodgkin's disease in Costa Rica: a report of 40 cases analyzed for Epstein-Barr virus. **Am J Clin Pathol**, v.109, p.618-624, 1998.
154. MONTISINOS-RONGEN, M. et al. Mutation of the p53 gene is a not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **Blood**, v.94, p.1755-1760, 1999.
155. MORENTE, M. M. 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**, v.90, n.6, p.2429-2436, 1997.
156. MUELLER, M. Epsteins Barr virus and hodgkin's disease: an epidemiological paradox. **EBV Rep**, v.4, p.12, 1997.
157. MUELLER, N. et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus: altered antibody pattern before diagnosis. **New Engl J Med**, v.320, p.689-695, 1989.
158. NEWCOM, S. R.; MUTH, L. H.; ANSARI, A. Interleukin-4 is an autocrine growth factor secreted by the L428 Reed-Sternberg cell. **Blood**, v.79, p.191-197, 1992.
159. NGUYEN, D. et al. Differential diagnosis between T-cell lymphoma and Hodgkin's disease: the value of mitotic counts and pericapsular infiltration. **Hematol Pathol**, v.3, n.2, p.63-71, 1989.
160. OBERLIN, O. 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**, v.10, p.1602-1608, 1992.
161. OGUZ, A. et al. Prognostic factors and treatment outcome in childhood Hodgkin disease. **Pediatr Blood Cancer**, v. 45, p.670-675, 2005.

162. OHSHIMA, K. et al. Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. **Histopathology**, v.38, n.4, p.368-375, 2001.
163. OLWENY, C. L.; KATONGOLE-MBIDDE, E.; KILRE, C. Childhood Hodgkin's disease in Uganda. **Cancer**, v.27, p.1295, 1301, 1971.
164. PACKEISEN, J. et al. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. **J Clin Pathol**, v.55, n.8, p.613-615, 2002.
165. PEH, S. C. et al. Epstein-Barr virus (EBV) and Hodgkin's disease in a multi-ethnic population in Malaysia. **Histopathology**, v.30, p.227-233, 1997.
166. PETRELLA, T. et al. CD15 antigen in Hodgkin's disease. **Pathol Res Pract**, v.185, n.6, p.886-890, 1989.
167. PINKUS G. S.; THOMAS P.; SAID J.W. LeuM1 – A marker for Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: An immunoperoxidase study of paraffin-embedded tissues. **Am J Pathol**, v.119; p.244-252, 1985.
168. POPE, J. H.; HORNE, M. K.; SCOTT, W. Transformation of foetal human leukocytes *in vitro* by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. **Int J Cancer**, v.3, p.857-866, 1968.
169. POPPEMA, S. et al. Lymphadenopathy morphologically consistent with Hodgkin lymphoma associated with Epstein-Barr virus infection. **Am J Clin Pathol**, v.84, p.385-390, 1985.
170. POPPEMA, S. Immunobiology and pathophysiology of Hodgkin lymphomas. **Hematology**, p.231-238, 2005.
171. PRECIADO, M. V. et al. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein (LMP) in tumor cells of Hodgkin's disease in pediatric patients. **Med Pediatr Oncol**, v.24, p.1-5, 1995.
172. PRECIADO, M. V. et al. Presence of Epstein-Barr virus and strain type assignment in argentine childhood Hodgkin's disease. **Blood**, v.10, n.10, p.3922-3929, 1986.
173. PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO / BRASIL. Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil. **Índice de Desenvolvimento Humano**. Disponível em <<http://www.pnud.org.br/atlas/oque/index.php>>. Acesso em: 06 janeiro 2007.
174. RAPPAPORT, H. et al. Report of the committee on histopathological criteria contributing to staging of Hodgkin's disease. **Cancer Res**, v.31, p.1864-1865.

175. RASSIDAKIS, G. Z. et al. BAX expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: correlation with clinical outcome. **Clin Cancer Res**, v.8, n.2, p.488-493, 2002b.
176. RASSIDAKIS, G. Z. 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**, v.20, n.5, p.1278-1287, 2002a.
177. RATKIN, G. A. et al. Correlation of anemia with infradiaphragmatic involvement in Hodgkin's disease and other malignant lymphomas. **Can Med Assoc J**, 1974;111:924-927, 1974.
178. RAZZOUK, B. I. et al. Epstein-Barr virus in pediatric Hodgkin disease: age and histiotype are more predictive than the geographic region. **Med Pediatr Oncol**, v.28, p.248-254, 1997.
179. RE, D. et al. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. **Blood**, v.105, n.12, p.4553-4560, 2005.
180. RE, D. et al. Genetic instability in Hodgkin's lymphoma. **Annals Oncol**, v.13, s.1, p.19-22, 2002.
181. RE, D.; KÜPPERS, R.; DIEHL, V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. **J Clin Oncol**, v.23, n.26, p.6379-6386, 2005.
182. RICKINSON, A. B.; KIEFF, E. N. Epstein-Barr virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Org). **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. p.2575-2627.
183. ROSDAHL, N.; LARSEN, S. O.; CLEMMESSEN, J. Hodgkin's disease in patients with previous mononucleosis: 30 years experience. **Br Med J**, v. 2, p.253-256, 1974.
184. SABATTINI, E. et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. **Clin Pathol**, v.51, n.7, p.506-511, 1998.
185. SAMOSZUK, M. ; NANSEN, L. Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. **Blood**, v.75, p.13-16, 1990.
186. SAMPLE, J. et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. **J Virol** v.64, p.4084-4092, 1990.

187. SÁNCHEZ-AGUILERA, A. et al. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.108, n.2, p.662-668.
188. SANDVEJ, K. et al. Analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP-1) gene and promoter in Hodgkin's disease isolates: selection against EBV variants with mutations in the LMP-1 promoter ATF-1/CREB-1 binding site. **Mol Pathol** v.53, p.280-288, 2000.
189. SCHELLONG, G. et al. High cure rates and reduced long-term toxicity in pediatric Hodgkin's disease: the German-Austrian multicenter trial DAL-HD90. The German-Austrian multicenter trial HD-90. The German-Austrian Pediatric Hodgkin's Disease Study Group. **J Clin Oncol**, v.17, p.3736-3744, 1999.
190. SCHMID, C. et al. Expression of B cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, v.139, p.701-707, 1991.
191. SHANKAR, A. G. et al. Does histology influence outcome in childhood Hodgkin's disease? Results from the United Kingdom Children's Cancer Study Group. **J Clin Oncol**, v.15, p.2622-2630, 1997.
192. SKINNIDER, B. F. et al. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.97, n.1, p.250-255, 2001.
193. SPECHT, L. et al. Radiotherapy versus combined modality in early stages. **Annals Oncol**, v.3, p.77-81, 1992.
194. SPECHT, L. ; NISSEN, N. I. Hodgkin's disease and age. **Eur J Haematol**, v.43, p.127-135, 1989.
195. SPECHT, L.; NISSEN, N. I. Prognostic factor in Hodgkin's disease stage III with special reference to tumour burden. **Eur J Haematol**, v.41, p.80-87, 1988.
196. SPECTOR, N. et al. C-MOPP/ABV yields good results in a public hospital population with Hodgkin's disease in Brazil. **Cancer**, v.71, p 2823-2827, 1993.
197. SPITZ, M. R. et al. Ethnic patterns of Hodgkin's disease incidence among children and adolescents in the United States, 1973-1982. **J Natl Cancer Inst**, v.76, p.235-239, 1986.
198. STABER, P. B. et al. mRNA expression patterns indicate CD30 mediated activation of different apoptosis pathways in anaplastic large cell lymphoma but not in Hodgkin's lymphoma. **Leukemia Research**, v.30, p.343-348, 2006.

199. STEFANOFF, C. G. et al. Laboratory strategies for efficient handling of paraffin-embedded tissues for molecular detection of clonality in Non-Hodgkin lymphomas. **Diagn Molec Pathol**, v.12, p.79-87, 2003.
200. STEIN, H. et al. Hodgkin and Sternberg-Reed cells contain antigens specific to late cells of granulopoiesis. **Int J Cancer**, v.29, p.283-290, 1982.
201. STEIN, H. et al. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence the Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. **Blood**, v.66, p.848-858, 1985.
202. STILLER, C. A. What causes Hodgkin's disease in children? **Eur J Cancer**, v.34, p.523-528, 1998.
203. STRUM, S. B.; RAPPAPORT, H. Interrelations of the histologic types of Hodgkin's disease. **Arch Pathol**, v.91, p.127-134, 1971.
204. STRUM, S. B.; RAPPAPORT, H. Significance of focal involvement of lymph nodes for the diagnosis and staging of Hodgkin's disease. **Cancer**, v.25, p.1314-1319, 1970.
205. THORLEY-LAWSON, D. A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 1, p.75-82, 2001.
206. TOTH, J.; DWORAK, O.; SUGAR, J. Eosinophil predominance in Hodgkin's disease. **Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol**, v.89, n.1, p.107-111, 1977.
207. TZANKOV, A. et al. Expression of B-cell markers in classical hodgkin lymphoma: a tissue microarray analysis of 330 cases. **Mod Pathol**, v.16, n.11, p.1141-1147, 2003b.
208. TZANKOV, A. et al. Prognostic significance of CD20 expression in classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathology study of 119 cases. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.1381-1386, 2003a.
209. VAN DEN BERG, A.; VISSER, L.; POPPEMA, S. High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells: a possible explanation for the characteristic T-Cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. **Am J Pathol**, v.154, p.1685-1691, 1999.
210. VAN SPRONSEN, D. J. et al. Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972-92. **Br J Haematol**, v.96, p.322-327, 1997.

211. VAN WASIELEWSKI, R. et al. Classical Hodgkin's disease: clinical impact of the immunophenotype. **Am J Pathol**, v.151, p.1123-1130, 1997.
212. VASSALLO, J. et al. Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients. **Haematologica**, v.86, p.1227-1228, 2001.
213. VASSILAKOPOULOS, T. P. et al. Hodgkin's disease in first relapse, after complete remission achieved by chemotherapy \pm radiation therapy. An analysis of outcome and prognostic factors. **Leuk Lymphoma**, v.29, p.156, 1998.
214. VASSILAKOPOULOS, T. P. et al. Prognostic factors in advanced stage Hodgkin's lymphoma: the significance of the number of involved anatomic sites. **Eur J Haematol**, v.67, p.279-288, 2001.
215. VASSILAKOPOULOS, T. P. et al. Development and validation of a clinical prediction rule for bone marrow involvement in patients with Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.105, p.1875-1880, 2005.
216. VESTLEV, P. M. et al. Prognosis of Hodgkin's disease is not influenced by Epstein-Barr virus latent membrane protein. **Int J Cancer**, v. 50, p. 670-671, 1992.
217. VON WASIELEWSKI, R. et al. Classical Hodgkin's disease: clinical impact of the immunophenotype. **Am J Pathol**, v.151, p.1123-1130, 1997b.
218. VON WASIELEWSKI, R. et al. Lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. An immunohistochemical analysis of 208 reviewed Hodgkin's disease cases from the German Hodgkin Study Group. **Am J Pathol**, v.150, p.793-803, 1997a.
219. VON WASIELEWSKI, R. et al. Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. **Blood** v.95, n.4, p.1207-1213, 2000.
220. VON WASIELEWSKI, S. et al. Nodular sclerosing Hodgkin disease : new grading predicts prognosis in intermediate and advanced stages. **Blood**, v.101, n.10, p.4063-4069, 2003.
221. VOÛTE, P. A.; KALIFA, C.; BARRET, A. **Cancer in Children: Clinical Management**. 2. ed. Great Britain: Oxford, 1998. p.137-153.

222. WANG, J; TAYLOR, C. R. Apoptosis and cell cycle-related genes and proteins in classical Hodgkin lymphoma: application of tissue microarray technique. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.11, n.3, p.206-213, 2003.
223. WATANABE, K. et al. Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. **Histopathology**, v.36, p.353-361, 2000.
224. WEINER, M. A. et al. Randomized study of intensive MOPP-ABVD with or without low-dose total-nodal radiation therapy in the treatment of stages IIB, IIIA2, IIIB, and IV Hodgkin's disease in pediatric patients: a Pediatric Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v.15, p.2769-2779, 1997.
225. WEINREB, M. et al. Epstein-Barr virus (EBV) and Hodgkin's disease in children: incidence of EBV latent membrane protein in malignant cells. **J Pathol**, v.168, p.365-369, 1992.
226. WEINREB, M. et al. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographic areas. **Arch Dis Child**, v.74, p.27-31, 1996.
227. WIJLHUIZEN, T. J. et al. Grades of nodular sclerosis (NSI-NSII) in Hodgkin's disease: are they independent prognostic value? **Cancer**, v.63, p.1150-1153.
228. ZANDER, T.; WIEDENMANN, S. WOLF, J. Prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. **Ann Oncol**, v.13, p.67-74, 2002.
229. ZARATE-OSORNO, A. et al. Hodgkin's disease in Mexico. Prevalence of Epstein-Barr virus sequences and correlations with histologic subtype. **Cancer**, v.75, p.1360-1366, 1995.
230. ZHENG, B. et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by the proteasome inhibitor PS-341 in Hodgkin disease cell lines is independent of inhibitor of nuclear factor-kappaB mutations or activation of the CD30, CD40, and RANK receptors. **Clin Cancer Res**, v.10, n.9, p.3207-3215, 2004.
231. ZHOU, X. G. et al. The association between Epstein-Barr virus and Chinese Hodgkin's disease. **Int J Cancer**, v.55, p.359-363, 1993.
232. ZHOU, X. G. et al. Epstein-Barr virus (EBV) in chinese pediatric Hodgkin disease. **Cancer**, v.92, n.6, p.1621-1631, 2001.
233. ZHOU, X. G. et al. Epstein-Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. **J Gen Virol** v.82, p.1157-1167, 2001.

234. ZUKERBERG, L. R. et al. Coexpression of CD15 and CD20 by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, v.130, p.475-483, 1991.

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: Trabalhos submetidos à publicação

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.

ESTADIAMENTO	DROGAS	RADIOTERAPIA
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.

ESTADIAMENTO	DROGAS	RADIOTERAPIA
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.

ESTADIAMENTO	DROGAS	RADIOTERAPIA
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 – TRABALHOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO