



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

**UTILIZAÇÃO DA FRUTALINA, UMA LECTINA α D-GALACTOSE
LIGANTE DE *ARTOCARPUS INCISA* L., NO ESTUDO DOS
LINFOMAS DE HODGKIN FORMA CLÁSSICA**

ANA PAULA NUNES CONSTANCIO

**FORTALEZA
2005**

ANA PAULA NUNES CONSTANCIO

**UTILIZAÇÃO DA FRUTALINA, UMA LECTINA α D-GALACTOSE
LIGANTE DE *ARTOCARPUS INCISA* L., NO ESTUDO DOS
LINFOMAS DE HODGKIN FORMA CLÁSSICA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho

FORTALEZA

2005

C 757u Constancio, Ana Paula Nunes

Utilização da Frutalina, uma lectina α D-Galactose ligante de *Artocarpus incisa* L., no estudo do Linfoma de Hodgkin / Ana Paula Nunes Constancio. - Fortaleza, 2005.

111 f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Departamento de Patologia

1.Doença de Hodgkin. 2. Frutalina. 3. Lectina. 4. Histoquímica. I. Título.

ANA PAULA NUNES CONSTANCIO

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em: 16/09/2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho

Departamento de Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Ceará
Orientador

Prof. Dr. Francisco Valdeci Almeida Ferreira

Laboratório Patologia Prof Livino Pinheiro
Hospital do Câncer/Instituto do Câncer do Ceará (LPLP) Prof.^a Dr^a Selma Lessa de Castro
Serviço de Oncologia e Hematologia Pediátrica
Hospital Infantil Albert Sabin

Prof.^a Dr^a Maria da Silva Pitombeira

Serviço de Hematologia/Faculdade de Medicina
Universidade Federal do Ceará

Ao progresso da ciência na Oncologia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, **Caio**, que foi gerado e nasceu junto com a realização deste projeto, e que, sem querer, passou pelo seu primeiro desafio na vida em prol da ciência.

A **Faraday**, pelo carinho, amor, disponibilidade e força estimuladora.

A minha **família** que, mesmo distante, é e sempre será a base da minha formação pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira**, uma prova admirável de dedicação plena à ciência.

Ao **Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho**, por ter me acolhido como orientanda e por sua constante presença e dedicação a este projeto.

Ao **Dr. Daniel William Lustosa, Dr^a Georgina Goes Lins e Dr^a Fabíola Melo**, pelo tempo cedido para que se concretizasse este projeto.

Aos **professores** do Curso de Mestrado, pelos seus saberes e por todos os ensinamentos recebidos.

Ao **Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará** pelo serviço de qualidade que presta a comunidade e estímulo constante e diário a pesquisa.

A todos os profissionais do **Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital Infantil Albert Sabin**, responsáveis pela minha formação profissional e pela dedicação aos pacientes.

Ao Departamento de Bioconjugados e Lectinas da Universidade Federal do Ceará, especialmente na pessoa do **Dr. Marcos Vinicius Liberato Milhome**, pela viabilização do projeto.

À **Paula, Margareth e Franzé**, funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal, pessoas que direta e indiretamente mantêm o funcionamento deste Mestrado.

A todos **colegas** do Curso de Mestrado, pelo apoio e amizade durante estes anos de convivência.

A **todos** os que colaboraram ou participaram desta pesquisa, o meu muito obrigado.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Avidin Biotin Complex (Complexo avidina- biotina-peroxidase)
ABVD	Adribalstina, Bleomicina, Vimblastina e Dacarbazina
ASP	<i>Asparagus pea</i>
Bcl 2	Oncogen com atividade antiapoptótica
BPA	<i>Bauhinia purpúrea</i>
CD	Cluster of designation
CD 3	Marcador para diferenciação T
CD 15	Antígeno associado aos granulócitos (Leu-M1; C3D-1; BG-7)
CD 30	Antígeno Ki-1 (Ber-H2)
CD 20	Antígeno pan-B (L26)
CD 45	Antígeno Leucocitário Comum, LCA (PD7/26 e2B11)
CD 74	Marcador citoplasmático, cora histiócitos e linfócitos B
CDw75	Marcador citoplasmático e de superfície, cora linfócitos centro foliculares e normais
Con A	Concanavalina ensiformis
CM	Linfoma de Hodgkin, subtipo Celularidade Mista
DA	Doença avançada
DAB	Diaminobenzidina
DH	Doença de Hodgkin
DL	Doença localizada
EBV	Epstein-Barr vírus
EMA	Antígeno Epitelial de Membrana
EN	Linfoma de Hodgkin, subtipo Esclerose Nodular
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
Estrepto ABC	Estreptoavidina biotina peroxidase
EUA	Estados Unidos da América
Fb	Frutalina biotilinaada
Fbc	Frutalina biotilinaada, marcação citoplasmática
Fbg	Frutalina biotilinaada, marcação golgiana
Fbm	Frutalina biotilinaada, marcação membranar
GHSG	German Hodgkin's Lymphoma Study Group

HE	Hematoxilina-Eosina
HIS	Hibridização in situ
HPA	Lectina <i>Helix pomatia</i>
ICC/HC	Instituto do Câncer do Ceará/Hospital do Câncer
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
IPATIMUP	Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto
IPS	International prognostic score
LABLEC	Laboratório de Lectinas e Bioconjugados do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará
LH	Linfoma de Hodgkin
LHc	Linfoma de Hodgkin, forma clássica
LHCM	Linfoma de Hodgkin, subtipo Celularidade Mista
LHDL	Linfoma de Hodgkin, subtipo Depleção Linfocitária
LHEN	Linfoma de Hodgkin, subtipo Esclerose Nodular
LHIN	Linfoma de Hodgkin interfolicular
LHPLN	Linfoma de Hodgkin, subtipo Predominância Linfocitária nodular
LHRL	Linfoma de Hodgkin, subtipo Rico em Linfócito
LMP-1	Latent membran protein
LNH	Linfoma não Hodgkin
LPLP	Laboratório de Patologia Prof. Livino Pinheiro
µm	Micrômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAP	Peroxidase anti-peroxidase avidina biotina
PCR	Polimerase chain reaction
PNA	Peanut agglutinin (<i>Arachis hypogaea</i>)
RD	Resposta Desfavorável
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RF	Resposta Favorável
RS	Células de Reed Sternberg

TARC	<i>CC thymus e activation related - chemokine</i>
TBS	<i>Tris Buffered Salina</i>
TRIS – HCL	Tampão tris
SBA	Lectina da soja
UFC	Universidade Federal do Ceará
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
WGA	Aglutinina do germe de trigo (<i>Wheat Germ Agglutinin</i>)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Freqüência da expressão pelo CD15 nas células RS e variantes, segundo o subtipo histológico.....	27
Tabela 2	Freqüência da expressão pelo CD30 nas células RS e variantes, segundo o subtipo histológico.....	27
Tabela 3	Resultado de estudos utilizando lectinas em LH (Revisão Medline e Lilacs - 1980-2005).....	36
Tabela 4	Distribuição, segundo a faixa etária, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	49
Tabela 5	Freqüência das características morfológicas, clínicas, de estadiamento e de resposta ao ABVD em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará (n = 54).....	51
Tabela 6	Freqüência do subtipo histológico do LHc, segundo o sexo, em uma amostra de LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	52
Tabela 7	Freqüência do fenótipo das células RS e variantes, segundo o tipo histológico em uma amostra de LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	53
Tabela 8	Prevalência da combinação dos fenótipos das células RS e variantes em uma amostra de pacientes com LHc, ICC/HC, 1999-2005, Fortaleza, Ceará.....	54
Tabela 9	Freqüência de marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo as características clínicas e de estadiamento, em uma amostra de pacientes com LHc, ICC/HC, 1999-2005, Fortaleza, Ceará.....	55
Tabela 10	Freqüência da marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo a extensão da doença, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza Ceará.....	57

Tabela 11	Freqüência da marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo a resposta inicial ao ABVD, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	57
Tabela 12	Freqüência da marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo o subtipo histológico, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, Fortaleza, Ceará.....	58
Tabela 13	Comparação entre a freqüência de positividade a Fb e o fenótipo das células RS e variantes, segundo o subtipo histológico, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	59
Tabela 14	Freqüência da marcação das células RS e variantes pela Fb, em relação à expressão de CD15, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	60
Tabela 15	Freqüência da marcação das células RS e variantes pela Fb, em relação à expressão de CD20, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	60
Tabela 16	Freqüência das combinações dos padrões de positividade pela Fb nas células RS e variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	62
Tabela 17	Freqüência da positividade pela Fb nas células RS e variantes, segundo a intensidade de marcação, em uma amostra de LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	63
Tabela 18	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipo histológico e o sexo, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	65

Tabela 19	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com o subtipo histológico e a faixa etária, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	66
Tabela 20	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a presença de recidiva, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	67
Tabela 21	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e o número de linfonodos, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	68
Tabela 22	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a presença de sintoma B, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	69
Tabela 23	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a presença de doença Bulky mediastinal, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	70
Tabela 24	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a infiltração extralinfonodal (baço, medula óssea ou fígado), 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	71
Tabela 25	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes em uma	

	amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a extensão da doença, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	72
Tabela 26	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a resposta inicial ao ABVD, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	73
Tabela 27	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a expressão de CD15, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	74
Tabela 28	Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a expressão de CD20, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fruta-pão (<i>Artocarpus incisa</i>).....	14
Figura 2	Célula Reed Sternberg.....	21
Figura 3	Distribuição, segundo o sexo, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	50
Figura 4	Distribuição, segundo a extensão da doença, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.....	53
Figura 5	Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (400x) Observa-se célula RS com marcação tipo Fbg (paranuclear puntiforme). Pequenos linfócitos negativos.....	76
Figura 6	Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (em imersão, 1000x). Observa-se célula RS com marcação tipo Fbg (paranuclear puntiforme).....	76
Figura 7	Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (em imersão, 1000x). Observa-se célula RS com marcação pelo CD15 (paranuclear puntiforme).....	77
Figura 8	Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (em imersão, 1000x). Observa-se histiócitos com marcação citoplasmática pela Fb.....	77

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Classificação modificada de Ann Arbor para estadiamento do Linfoma de Hodgkin.....	20
Quadro 2	Classificação histológica da OMS para os LH (2001).....	22
Quadro 3	Correlações clínico-patológicas dos LHc.....	25
Quadro 4	Imunofenótipo do LH de acordo com o subtipo histológico.....	28
Quadro 5	Fatores indicativos de bom prognóstico no LH localizado.....	29
Quadro 6	Fatores indicativos de prognóstico desfavorável no LH avançado de acordo com o escore prognóstico internacional (IPS)	30
Quadro 7	Fatores morfológicos e biológicos relacionados a prognóstico em LH (Revisão Medline 1970 – 2005).....	32
Quadro 8	Parâmetros clínicos relacionados ao prognóstico em LH (Revisão Medline 1993-2005).....	33
Quadro 9	Parâmetros laboratoriais relacionados ao prognóstico em LH (Revisão Medline 1993-2005).....	34

LISTAS DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Comparação das porcentagens do tipo de marcação: Fbg, Fbc, Fbm, pela Fb nas células RS e variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará..... 61
- Gráfico 2:** Comparação da frequência de positividade das células RS e variantes pela Fb nos padrões: Fbg, Fbc, Fbm, segundo os subtipos histológicos LHCM e LHEN, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará..... 64

RESUMO

Introdução: A transformação neoplásica está associada a alterações na composição dos carboidratos celulares, que determinam características especiais à célula, tais como comportamento, crescimento, diferenciação e adesividade. Lectinas são proteínas que apresentam afinidade por carboidratos específicos e por isso têm sido usadas em muitas áreas de investigação diagnóstica e prognóstica do câncer e das metástases. O Linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia heterogênea em relação a aspectos clínicos, biológicos e de resposta ao tratamento. Existe atualmente uma intensa procura de novos marcadores que possam ter valor prático na previsão de comportamento e prognóstico do LH. Este estudo investiga em casos de LH forma clássica (LHc) a expressão de glicoconjugados específicos para *Artocarpus incisa* L (frutalina), uma lectina vegetal α D-Galactose ligante, nas células de Reed-Sternberg (RS) e suas variantes. **Material e Métodos:** O estudo foi feito em 54 blocos de parafina de linfonodos com diagnóstico morfológico e imunohistoquímico de LHc, 31 do tipo Esclerose Nodular (LHEN), 18 do tipo Celularidade Mista (LHCM), 3 do tipo Interfolicular (LHIN) e 2 do tipo Rico em Linfócitos (LHRL). Foram realizados cortes histológicos na espessura de 3 micrômetros (μ m), fixados em lâminas silanizadas e processados pela técnica da estrepto-avidina-biotina-peroxidase (estrepto ABC) utilizando a frutalina biotilada (Fb) como sonda. Como controles positivos, casos de carcinoma papilífero de tireóide e, negativos, os cortes do estudo com a exclusão da Fb. Dados clínicos foram obtidos por revisão de prontuários. **Resultados:** Foram detectados três padrões de positividade: citoplasmática (Fbc), membranar (Fbm) e golgiana (Fbg) (coloração puntiforme paranuclear), que também foram classificadas segundo a intensidade: fraca (+) e forte (++)/+++). A positividade global para Fb nas células RS e suas variantes foi de 85,2% (46/54), frequência igual a da positividade global da amostra para o CD15. O padrão de marcação Fbg foi o mais freqüente aparecendo em 91,3% (42/46) dos casos positivos ($p=0,008$). Não foi observada associação estatisticamente significativa entre a marcação pela frutalina e os dados clínicos e de estadiamento; resposta inicial ao tratamento; subtipo histológico e fenótipo do LHc. **Conclusão:** A Fb pode ser utilizada como marcador para células RS e variantes. O seu uso, associado ao estudo morfológico, pode ser útil para o diagnóstico de LHc.

Com este número de casos ainda não foram observadas correlações do padrão de marcação com apresentação clínica ou fatores oncobiológicos tidos como indicadores de prognóstico do LHc.

Palavras-chave: Doença de Hodgkin, Frutalina, Lectina, Histoquímica.

**USED OF FRUTALIN, A α -D GALACTOSIDE BINDING LECTIN OF
ARTOCARPUS INCISA, ON STUDY OF CLASSICAL HODGKIN'S DISEASE**

Department of Pathology and Legal Medicine

Federal University of Ceará

ABSTRACT

Introduction: Neoplastic transformation is associated with alterations in the composition of cellular carbohydrates, which determine special cellular characteristics, such as behavior, growth, differentiation and adhesivity. Lectins are proteins which have affinity with specific carbohydrates, so they serve as tools in several fields of diagnostic and prognostic investigations on cancer and on metastases. Hodgkin's Lymphoma (HL) is an heterogenous neoplasia in clinical, biological, and responsive aspects concerning treatment. There is currently an intense search for new markers which can have practical value in predicting HL behavior and prognosis. This study investigates, in cases of HL classical form (CHL) the expression of specific glyconjugates for *Artocarpus incisa* L (frutalin), a vegetable α D-galactose-binding lectin, in Reed-Sternberg cells (RS) and their variations.

Materials and Methods: The study assessed 54 paraffin blocks containing lymphonodes with morphological and immunohistochemical diagnosis for CHL; 31 of the Nodular Esclerosis type (HLNE); 18 of the Mixed Cellularity type (HLMC); 3 of the Inter-follicular type (HLIN); and 2 of the Lymphocyte-rich type (HLLR). Then 3- μ m histological cuts were made and fixed to slyated slides and processed through the strep-avidin-biotin-peroxidase technique (strep ABC), using the biotilinated frutalin (Fb) as probe. Cases of thyroid's papillary carcinoma were considered positive controls; study's cutoffs excluding Bf were considered negative ones. Clinical data were obtained through records review. **Results:** Three positivity patterns have been detected: cytoplasmic (Fbc), membranous (Fbm) and golgian (Fbg) (paranuclear punctiform coloration), which were also classified according to intensity: weak (+) and strong (++/+++). Global positivity for Fb in RS cells was 85.2% (46/54), same frequency as global positivity of CD15 sample. The Fbg marking pattern was the most frequent one, present in 91.3% (42/46) of positive cases (p=0.008). No statistically significant association was observed between frutalin markers, and clinical and stadiament data; initial response to treatment; CHL histological and

phenotype subtype. **Conclusion:** Fb can be used as marker for RS cells and their variations. This use, associated with the morphological study, can be an useful tool for CHL diagnosis. With this number of cases, no correlation between marking pattern and clinical presentation or oncobiological factors that could be considered a prognosis indicator for CHL has been observed so far.

Key words: Hodgkin's Disease; Frutalin; Histochemical; Lectin.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE GRÁFICOS

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Justificativa de Estudo.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Lectinas	5
2.1.1 Aspectos Gerais	5
2.1.2 Lectinas e Câncer.....	9
2.2 Frutalina:uma Lectina vegetal α D-Galactose ligante de <i>Artocarpus incisa</i> L.....	11
2.3 Linfoma de Hodgkin	14
2.4 Lectinas e Linfoma de Hodgkin.....	34
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Tipo de Estudo	40
4.2 Locus do Estudo.....	40
4.3 População do Estudo.....	40
4.4 Estudo Clínico.....	42

4.5 Estudo Histoquímico utilizando a Frutalina Biotilizada como Sonda.....	42
4.5.1 Preparo e Processamento dos Cortes Histológicos	42
4.5.2 Frutalina: Isolamento, Purificação e Biotinização	43
4.5.3 Técnica da Histoquímica utilizando Frutalina Biotilizada	45
4.6 Protocolo para Análise e Padronização da Leitura do Resultado do Estudo Histoquímico.....	47
4.7 Análise Estatística.....	48
4.8 Aspectos Éticos	48
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÃO.....	95
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	96
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
APÊNDICES E ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A transformação neoplásica, no geral, está associada com alterações da membrana celular, principalmente na composição dos carboidratos. Estas alterações determinam características especiais à célula, tais como crescimento, diferenciação, adesividade e invasão (MUSTAC; MELATO; SASSO, 1996; SCHUMACHER et al., 1996). O estudo das alterações dos carboidratos na membrana da célula neoplásica e o estudo da interação da célula alterada com o ambiente extracelular podem ajudar na compreensão do comportamento e da capacidade metastática da neoplasia. Já, há alguns anos, pesquisadores têm utilizado as lectinas para o estudo destas alterações na composição dos carboidratos da membrana celular.

Lectinas são proteínas, de origem não imune, que apresentam afinidades por carboidratos específicos e podem ser isoladas de bactérias, plantas ou animais. Atualmente, após anos de pesquisa, tem-se nas plantas a principal fonte de lectinas. A habilidade das lectinas vegetais servirem como marcadores de alterações de açúcares na superfície celular como meio para distinguir células normais e neoplásicas foi descrito inicialmente em 1963 por Aub e cols. (*apud* FERREIRA, 2001). Desde então muitos estudos têm sido realizados com lectinas para demonstrar alterações na seqüência terminal de carboidratos dos glicoconjugados da membrana celular em uma variedade de lesões neoplásicas com objetivo de melhor entender vários aspectos do câncer e das metástases (MODY; JONSHI; CHANEY, 1995).

A frutalina é uma lectina vegetal que pertence à família *Moráceae*, gênero *Artocarpus*, recentemente caracterizada (MOREIRA; OLIVEIRA, 1983), extraída da fruta pão e abundante em nosso meio. A sua extração é relativamente simples e necessita de poucos recursos financeiros. Das lectinas vegetais já estudadas, a jacalina e a frutalina, lectinas do mesmo gênero, apresentam interesse por serem ligantes de alguns tipos de imunoglobulinas, linfócitos e de células tumorais (ROQUE-BARREIRA; CAMPOS-NETO, 1985; URDIALES-VIEDMA et al., 1995). Devido estas propriedades descritas, poderá representar uma promissora ferramenta em histoquímica e imunologia celular neoplásica.

Existem trabalhos utilizando a frutalina em câncer de mama (FERREIRA, 2001) e de tireóide (MILHOME, 2003; MILHOME et al., 2004) com resultados animadores em relação à progressão tumoral no câncer de mama e à diferenciação de epitélio normal e neoplásico no câncer de tireóide. Ainda não existem estudos mostrando a marcação pela frutalina em doenças linfoproliferativas.

Linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia do tecido linfóide definida histopatologicamente pela presença de células tumorais gigantes, chamadas de Reed Sternberg (RS), rodeadas por células inflamatórias benignas, compostas por linfócitos, histiócitos e granulócitos, incluindo eosinófilos, células plasmáticas e fibroblastos (BANKS, 1995). O diagnóstico de certeza depende da presença das células RS e de suas variantes chamadas de células de Hodgkin (CH). Apesar de não existir anticorpo monoclonal específico para células RS e suas variantes, a imunohistoquímica com utilização de anticorpos monoclonais como: anticorpo anticélulas T (CD3), Leu M1(CD15), Pan B (CD20), BerH2 (CD30), antígeno comum leucocitário (CD45) e antígeno de membrana epitelial (EMA), auxiliam na confirmação diagnóstica e diagnóstico diferencial com neoplasias e doenças inflamatórias que apresentam células RS *símiles* (STEIN et al., 2001).

Atualmente, existem fortes evidências que confirmam que as células RS e suas variantes são derivadas de células B do centro germinativo, mas apesar de grandes progressos no conhecimento da biologia do LH e na origem das células RS e suas variantes, muitas questões ainda não foram elucidadas. Persistem dúvidas em relação aos eventos básicos da transformação neoplásica, ao mecanismo de ação dos vírus oncongênicos na patogenia da doença, ao mecanismo que permite as células RS resistirem a apoptose no centro germinativo e as causas moleculares de suas características fenotípicas. Devido à diversidade do tecido linfóide e a fatores ainda desconhecidos, o LH se apresenta como uma neoplasia complexa e heterogênea em relação a aspectos clínicos e biológicos, e isto resulta em uma confusa divisão em grupos com diferentes prognósticos.

Desde a primeira descrição da doença feita por Thomas Hodgkin em 1832, os LH têm sido amplamente estudados e várias pesquisas tentam correlacionar estadiamento clínico, alterações laboratoriais (PROCTOR et al., 1992; SMOLEWSKI et al., 2000), alguns marcadores biológicos como CD15 - (VON WASIELEWSKI et al., 1997; BENHARROC et al., 2000), CD20+ (TZANKOOV et al.,

2003), p53, bcl-2 (BRINK et al., 1998; SMOLEWSKI et al., 2000) e infecção pelo vírus Epstein Barr (EBV) (ABREU et al., 1997; GLAVINA-DURDOV et al., 2001; MONTALBÁN et al., 2000; PINTO, 2003), com diagnóstico, comportamento e prognóstico do LH. Porém, até o momento, todos os critérios utilizados ainda falham, em alguns casos, na previsão de resposta favorável ou desfavorável ao tratamento e prognóstico (MONTALBÁN et al., 2004).

Poucos estudos foram realizados utilizando lectinas nos LH. A grande maioria das pesquisas tinha como objetivo determinar a existência de marcação pela lectina estudada nas células RS, no intuito de se descobrir um novo marcador específico que auxiliasse no diagnóstico do LH e facilitasse o diagnóstico diferencial. Alguns estudos tentavam também, baseados no tipo de marcação, decifrar a origem das células RS.

Möller em 1982 relatou o uso nos LH da lectina vegetal extraída do amendoim (PNA), uma lectina β D-galactose ligante de *Arachis hypogaea agglutinin*, e demonstrou uma proeminente, constante e característica marcação paranuclear (golgiana) nas células RS, concluindo que esta lectina poderia ser utilizada como um importante reagente para identificar lesões precoces com número reduzido de células tumorais.

Hsu e Jaffe (1984); Ree e Kadin (1985); Ree et al. (1989) e Sarker et al. (1992), tiveram resultados semelhantes com o uso de PNA nos LH, com positividade de marcação nas células RS variando de 59% a 85,7%. Outra lectina já utilizada foi a *Bauhinia purpúrea* (BPA), uma lectina com especificidade por N-acetil-galactosamina, e positividade de marcação nas células RS e suas variantes de 97%. Neste estudo foram descritos de três padrões de marcação: citoplasmático difuso, paranuclear e membranar (SARKER et al., 1992).

Strauchen (1984) descreveu que os receptores de lectinas eram potencialmente úteis como marcadores celulares na investigação de doenças linfoproliferativas, utilizando em seu estudo a PNA, Concanavalin A (Con A) e *Lotus tetragonolobus* (ASP) nos LH. Neste estudo observou-se positividade apenas citoplasmática a Con A, e ausência de marcação pela PNA e pela ASP.

Nenhum estudo publicado com LH e lectinas até a presente data correlacionou critérios clínicos ou de prognóstico com os padrões de marcação encontrados nas células RS e variantes.

1.2 Justificativa de Estudo

Nos últimos anos tem se observado uma marcada tendência na procura de novos, específicos e sensíveis marcadores que auxiliem na confirmação diagnóstica das neoplasias ou que possam ter valor prático para previsão de comportamento e prognóstico da doença. Ampliando a linha de pesquisa sobre o uso das lectinas no diagnóstico das neoplasias e impulsionado pela busca da ampliação do conhecimento sobre o comportamento biológico das células RS e suas variantes, este estudo investiga, em casos de LH, a existência da expressão de glicoconjugados específicos para *Artocarpus incisa* (frutalina), uma lectina vegetal α D-Galactose ligante, nas células RS e variantes, verificando se esta expressão pode ser utilizada como padrão para diagnóstico do LH, além de investigar se existe correlação do tipo de marcação com os parâmetros oncobiológicos tidos como avaliadores do prognóstico do LH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Buscando fundamentação teórica sobre a utilização das lectinas no estudo dos LH, destacam-se: estudos sobre as lectinas e suas funções principalmente na oncologia; descrição da frutalina e como foi utilizada desde a sua purificação e uma revisão sobre aspectos clínicos, patológicos e biológicos do LH.

O conteúdo literário contido neste capítulo está dividido em quatro partes: a primeira é uma revisão sobre lectinas; a segunda é sobre a frutalina; a terceira, sobre o LH e a quarta são estudos que utilizaram lectinas nos LH.

2.1 Lectinas

2.1.1 Aspectos Gerais

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas ligantes reversíveis de mono e oligossacarídeos com alta especificidade, em geral desprovidos de atividade catalítica e em contraste com os anticorpos, não são produtos de uma resposta imune. Muitas lectinas em geral possuem dois ou mais sítios de ligação de açúcares e podem aglutinar células e/ou precipitar complexos de carboidratos (PEUNANS; VAN DAMME, 1995).

O estudo das lectinas foi iniciado por Stillmark em 1888 (*apud* SHARON; LIS, 1972) que descobriu o fenômeno de hemoaglutinação com extratos de sementes de castor (*Ricinus communis*), denominada ricina. Mais tarde, Hellin (1891 *apud* SHARON; LIS, 1972), descobriu que extratos tóxicos de sementes de *Abrus precatorius* (abrina) também produziam aglutinação das células vermelhas. À medida que mais e mais fatores aglutinantes foram sendo descobertos em outras plantas, o termo hemaglutinina foi introduzido como um nome comum para todas as substâncias que exibiam esta propriedade biológica particular (ELFSTRAND, 1898 *apud* SHARON; LIS, 1972). Todavia, com a descoberta de que algumas hemaglutininas aglutinavam seletivamente eritrócitos de um grupo sanguíneo humano particular, dentro do sistema ABO, o novo termo lectina (derivado do latim

legere, que significa escolher) foi introduzido para ressaltar este aspecto de escolha (BOYD; REGUERE 1949 *apud* MOREIRA et al., 1991). No entanto, o termo lectina não ficou restrito e foi aplicado a todas as proteínas que apresentassem alguma propriedade aglutinante.

Com o progresso da purificação e caracterização das lectinas, logo foi demonstrado que as propriedades de aglutinação das lectinas estavam baseadas no reconhecimento específico e ligação a carboidratos (WATKINS; MORGAN, 1952 *apud* MILHOME, 2003). Motivados por este novo conhecimento, pesquisadores passaram a definir lectinas como proteínas ligantes a carboidratos de origem não imune, que aglutinam células ou precipitam glicoconjugados (GOLDSTEIN et al., 1980) e não modificam bioquimicamente os carboidratos ligantes (RÜDIGER e GABIUS, 2001).

As lectinas estão presentes em quase todos os seres vivos, podendo ser isoladas de vários meios, tais como microorganismos, plantas e animais. São agrupadas em quatro classes com base em seu tipo de carboidrato preferencial de ligação a açúcares do tipo D-piranoose, e de acordo com o que foi estabelecido por Makela em 1957 (*apud* MODY; JOSHI; CHANEY, 1995; MOREIRA et al, 1991): L-fucose (grupo I), galactose/N-acetil-galactosamina (grupo II) glicose/manose (grupo III). Até o momento não foram descobertas lectinas que interagem com grupo IV (idiose, glulose, L-glicose e L-xilose). Três novos grupos foram acrescentados àqueles de Makela: as lectinas específicas por N-acetil-glicosamina, por ácido siálico e por estruturas complexas (MODY; JOSHI; CHANEY, 1995). Nos grupos I, II e III foram descobertas lectinas específicas para os grupos sanguíneos, já que reconhecem açúcares envolvidos na estrutura antigênica dos grupos sanguíneos humanos A (N-acetil-galactosamina), B (D-galactose) e O (L-fucose).

As lectinas de origem animal são conhecidas como lectinas endógenas e são adicionalmente classificadas em: tipo C (Cálcio dependentes) e tipo S (tiol dependente, cátion dependente e normalmente solúvel) (DRIKAMER, 1988; HUGES, 1992).

Com base na estrutura das subunidades das lectinas (mais precisamente, nos produtos primários da tradução dos genes das lectinas) podem ser distinguidos cinco tipos principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, superlectinas e multilectinas.

As **merolectinas** são proteínas pequenas, formadas exclusivamente por um domínio ligante a carboidratos. Devido à sua natureza monovalente, as merolectinas não são capazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Poucas merolectinas foram descobertas, talvez pelo fato de não apresentarem atividade hemaglutinante. Exemplos bem conhecidos são a lectina heveína, extraída do látex de *Hevea brasilienses* (VAN PARIJS et al., 1991) e a proteína monomérica manose-ligante de orquídeas (VAN DAMME et al., 1994).

As **hololectinas** são formadas exclusivamente por domínios ligantes a carboidratos, porém, diferentemente das merolectinas, possuem dois ou mais destes domínios, idênticos ou homólogos, e se ligam ao mesmo, ou estruturalmente similar, açúcar. Por apresentarem mais de um sítio de ligação são capazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar eritrócitos. A maioria das lectinas já isolada pertence ao grupo das hololectinas (VAN DAMME et al., 1994).

As **quimerolectinas** são proteínas que além do grupo ligante de açúcar, possuem um outro domínio, não relacionado com este, possuindo uma atividade catalítica (ou uma outra atividade biológica) bem definida, que age independentemente dos domínios ligantes de carboidratos. Dependendo do número de sítios ligantes de açúcar, as quimerolectinas podem se comportar como hololectinas ou quimerolectinas (VANDAMME et al., 1994).

As **superlectinas** são um tipo especial de quimerolectina, formadas por dois domínios ligantes a carboidratos arranjados em seqüência estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados. Até o momento, a lectina de bulbos de tulipa é a única superlectina descrita (CAMUE; PEETERS; PEAUMANS, 1986).

Mais recentemente, Monteiro-Moreira (2002) ampliou a classificação criando o termo **Multilectinas**, ao mostrar a existência de lectinas que possuem dois ou mais domínios ligantes de carboidratos, idênticos, mas que podem se ligar a açúcares diferentes. É o caso da jacalina, lectina de sementes *Artocarpus integrifolia* (Moreira e Ainouz, 1977), e da frutalina, lectina de sementes de *Artocarpus incisa* (Moreira et al., 1998), que se ligam tanto a D-galactose quanto a D-manose.

Atualmente tem-se nas plantas a principal fonte de lectinas. Apesar do grande interesse pelas lectinas vegetais, pouco se sabe sobre suas funções na planta. Devido a sua capacidade de reconhecer carboidratos estranhos, presume-se que sua função tenha relação com mecanismos de defesa das plantas contra o ambiente hostil, vírus, bactéria e fungos, (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Porém, apesar das funções naturais das lectinas vegetais serem parcialmente compreendidas, pesquisadores encontraram diversas aplicações práticas para estas proteínas ao longo dos anos. Devido a sua capacidade de distinguir glicídios presentes em células humanas, as lectinas foram historicamente utilizadas para tipagem sanguínea. As lectinas também têm sido extensivamente utilizadas na caracterização da estrutura de glicoconjugados de células animais (MOREIRA et al., 2001).

Somente com o desenvolvimento tecnológico que resultou na purificação das lectinas foi possível um melhor entendimento da estrutura, ação e emprego destas moléculas. Os anos 80 deram início assim a uma nova fase no emprego das lectinas nas mais diversas áreas. Só como exemplo, em 1983 a lectina da soja (SBA) foi empregada com sucesso no preparo de medula óssea em transplante, reduzindo a doença enxerto versus hospedeiro (SHARON, 1998). Desde então as lectinas têm se mostrado como ferramentas poderosas tanto para propósito analítico como para pesquisas em bioquímica, genética, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas. A grande importância das lectinas se deve principalmente as suas inúmeras propriedades biológicas tais como aglutinação de eritrócitos e outras células como linfócitos, espermatozóides, plaquetas e bactérias; indução de mitoses em linfócitos e efeitos citotóxicos sobre linfócitos; diagnóstico e identificação de microorganismo; tipagem sanguínea e aglutinação de vírus (MOREIRA et al, 1991). Uma das suas maiores contribuições também tem sido no esclarecimento do papel de membranas celulares e subcelulares, aonde se utiliza lectinas marcadas com fluoresceína, radioativamente ou com imunomarcadores (SHARON, 1998).

A afinidade de lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido empregada também para identificação de microorganismos. Assim é que *Neisseria gonorrhoea* pode ser diferenciada de outras espécies de *Neisseria* por sua aglutinação com a lectina do germe de trigo (MOREIRA et al, 1991).

Na imunologia algumas lectinas são consideradas como mitógenos padrão, induzindo potente estimulação linfocitária (MOREIRA et al., 1991).

Em parasitologia a capacidade aglutinante das lectinas foi utilizada na análise de cepas de *Trypanosoma cruzii* e *Leishmania* (MOREIRA et al., 1991).

2.1.2 Lectinas e Câncer

A transformação neoplásica está relacionada a alterações da membrana celular, principalmente na composição dos carboidratos, que determinam características especiais as células relacionadas a fenômenos de diferenciação e maturação. Alterações no padrão de glicosilação de moléculas das células são freqüentes no processo de transformação neoplásica. Muitas vezes, estas alterações de glicosilação são mais freqüentes na metástase do que no tumor primário, sugerindo que estes padrões conferem vantagens seletivas às células tumorais ao longo do processo de progressão tumoral (do tumor primário à formação da metástase) (MORTARA et al., 2005). Como exemplo de glicosilação anormal, estudos com tumor de células transicionais de bexiga tem mostrado a função diminuída de uma transferase nos casos invasivos (acetilglucosaminiltransferase T2) comparado com os não invasivos, o que sugere que esta transferase pode estar envolvida na progressão do câncer e das metástases (MARTINEZ et al., 2002).

A habilidade de lectinas vegetais de servirem como marcadores de alterações celulares como meio para distinguir células normais e alteradas, foi descrita inicialmente em 1963 por Aub e cols. (*apud* FERREIRA, 2001). Aub e cols acreditavam que a diferença entre as células normais e as malignas estava na superfície celular, ou seja, alterações nas propriedades da superfície celular habilitariam as células cancerosas a continuar proliferando, se desprender do seu local inicial, espalhar-se pelo corpo e estabelecer novos focos tumorais. Para testar estas idéias examinaram as células modificadas com diversas enzimas. Apenas no caso de uma enzima, a lípase de germe de trigo, houve resposta positiva, isto é, as células normais não pareciam ser afetadas pela enzima enquanto as células malignas eram aglutinadas. Entretanto, quando a lipase pancreática substituía a lípase do germe do trigo, não havia aglutinação. Descobriram então que a

preparação da lipase de germe de trigo continha um contaminante protéico, que era responsável pela aglutinação. Posteriormente foi descoberto que a substância responsável por aquela reação era a aglutinina do germe de trigo (WGA) (MONTEIRO, 1998).

Desde então muitos estudos têm sido realizados para demonstrar alterações na seqüência terminal de carboidratos dos glicoconjugados intracelular e da membrana celular em uma variedade de lesões neoplásicas, com objetivo de melhor entender vários aspectos do câncer e das metástases. O uso das lectinas como ferramenta para o diagnóstico e terapêutica do câncer pode assim ser resumido:

- 1) Lectinas como sondas diagnósticas ligantes de carboidratos nas superfícies celulares;
- 2) Lectinas como marcador tumor-específicos com a produção de neoglicoproteínas, neoglicoenzimas, pseudopolissacarídeos, anticorpos anti lectinas que podem ser associados a radioisótopos, biotina, enzimas, fluorocromas, drogas tumorílicas, citotoxinas e oligonucleotídeo;
- 3) Lectinas como citotoxinas antitumorais, quer por ação direta (como ricina-RCA-I), quer por ativação de linfócitos;
- 4) Lectinas como imunotoxinas (lectinas citotóxica de plantas acopladas a anticorpos monoclonais);
- 5) Lectinas como indutores de resposta biológica, como ativação de linfócito e indução de liberação de linfocinas (MODY et al., 1995).

Os carboidratos da superfície celular podem mostrar níveis alterados de expressão em tumores primários e metastáticos. Também muitas mucinas associadas a tumores são identificadas em cânceres como os de mama, pâncreas, bexiga, cólon e próstata. O acúmulo de carboidratos tipo mucina simples como Tn, Sialil-Tn e T, em geral são expressos em carcinomas e possivelmente relacionados ao processo de carcinogênese (SCHMITT; MARINO, 1998). Ressalta-se que a lectina *Helix pomatia* (HPA) é um preditor de progressão tumoral em câncer de colo e está fortemente correlacionado com o acometimento de gânglios axilares em câncer de mama (BROOKS, 2000). Importantes estudos com lectinas também

foram realizados em doenças linfoproliferativas. Kaspers et al. (1996) mostraram que a positividade pela lectina PNA em crianças com leucemia linfóide aguda de células T, está relacionada a um prognóstico favorável, servindo como marcador de um subgrupo de pacientes com boa resposta a corticoterapia sistêmica. A lectina PNA também foi utilizada, com bons resultados, no diagnóstico diferencial entre linfomas foliculares e hiperplasia folicular benigna (REE; HSU, 1983).

2.2 Frutalina: uma lectina vegetal α D-Galactose ligante de *Artocarpus incisa* L.

Artocarpus incisa (fruta pão) pertence à família *Moraceae*, classe Magnoliadae e subclasse Hemaneliadae, sendo amplamente encontrada por todo Brasil. Esta família é formada aproximadamente por 75 gêneros e 1550 espécies tropicais, sendo que poucas ocorrem nas regiões temperadas. No Brasil podem ser encontrados 28 gêneros com cerca de 340 espécies. Somente foram isoladas e caracterizadas lectinas dos gêneros *Artocarpus* e *Maclura*. A primeira lectina isolada na família *Moraceae* foi de sementes da espécie *Maclura pomífera*. Esta lectina aglutina fortemente eritrócitos humanos e é mitogênica para linfócitos (BARROSO, 1978).

O gênero *Artocarpus* é composto aproximadamente por 50 espécies e, dentre estas, há várias que contêm lectinas em suas sementes que já foram isoladas e caracterizadas. A primeira delas foi isolada de sementes de *A. intergrifolia* (jaca) ficando conhecida como jacalina, sendo a lectina mais estudada deste gênero e de toda família. A jacalina é uma glicoproteína ligante de α D-galactopiranoídeos, embora ligue fortemente oligossacarídeos α ligados ao antígeno Thomsen-Friedenreich (T) mais fortemente que outros dissacarídeos. A jacalina tem reconhecidamente uma potente ação mitogênica nas células T, promove a ativação policlonal das células B na secreção de imunoglobulinas (BUNN-MORENO; CAMPOS-NETO, 1981) e interage com IgA humana se revelando ser um excelente meio para o estudo de IgA secretora e sérica (ROQUE-BARREIRA; CAMPOS-NETO, 1985). A estrutura tridimensional da jacalina complexada com metil α -D-galactose foi recentemente caracterizada por cristalografia em que cada subunidade

é formada por um β prisma simétrico, composto por três grupos de quatro folhas β . A lectina exibe um novo sítio ligante envolvendo N-terminal da cadeia α e que é gerado por modificações pós-tradução envolvendo proteólise, se constituindo no primeiro exemplo conhecido no qual tal modificação foi feita par conferir a especificidade por carboidratos. Este novo tipo de enovelamento é característico da família *Moráceae*. A estrutura fornece uma explicação à especificidade relativa da lectina por derivados de galactose e fornece detalhes da base estrutural de sua especificidade pelo antígeno T (SANKARANARYANAN et al., 1996).

Uma outra lectina manose específica com forte efeito estimulador da migração de neutrófilos foi detectada também em sementes de *A.intergrifolia* e isolada posteriormente (SANTOS et al., 1994) sendo denominada de KM+.

A espécie *A.incisa* popularmente conhecida como fruta-pão, é uma árvore de médio porte, podendo atingir 15 metros de altura, de raízes profundas e caule de casca cinzenta e lisa com 80 a 90 cm de diâmetro, folhas grandes de 30 a 90 cm de comprimento por 30 a 45 cm de largura, alternadas em simples, coriáceas, curvadas na base, recortadas em 5 a 7 lobos, raramente inteiras, de cor verde escura. Suas flores são sem pétalas e muito pequenas. Há duas variedades de fruta-pão que diferem exclusivamente no fruto. A variedade *apyrena* não possui sementes ou se as possui são atrofiadas (variedade não seminífera). A variedade com sementes, conhecidas como fruta-pão de caroço, possui fruto que pesa 1Kg, com epiderme formando protuberâncias hexagonais, massa ou polpa em pequena quantidade, envolvendo em média 80 sementes (Figura 1). Os primeiros estudos com a variedade seminífera de *A.incisa*, culminam no isolamento de uma lectina (MOREIRA; OLIVEIRA, 1983), posteriormente denominada frutalina (MOREIRA, 1998).

A frutalina é uma glicoproteína alfa-D galactose ligante, contendo 2,1% de carboidratos em sua estrutura. Apresenta elevados teores de aminoácidos ácidos, hidroxilados e hidrofóbicos e baixo teor de aminoácidos sulfurados e tem a capacidade de aglutinar hemácias de vários animais, aglutinando fortemente as hemácias humanas, porém não apresenta qualquer especificidade por antígenos do sistema ABO (MONTEIRO, 1998).

Também de sementes de *A. incisa* foi isolada uma lectina manose específica conhecida como frutapina e que apresenta muitas semelhanças com a KM+ (MONTEIRO,1998).

A frutalina tem sido utilizada em estudos envolvendo a resposta imune inata. Os resultados até o momento sugerem que a frutalina através de ligação a resíduos de galactose na superfície celular, estimula a proliferação de linfócitos e produção de IL-2 pela ativação da via AKt-PI3 e modulação pelo fator NFKappaB (PEREIRA et al., 2004). Brando - Lima e cols. (2005) demonstraram que a frutalina é capaz de induzir migração de neutrófilos humanos in vivo e in vitro através da interação açúcar proteína entre a lectina solúvel e a galactose presente na superfície do neutrófilo.

Postula-se que ocorra um específico rearranjo de glicoproteínas de superfície celular durante a transformação neoplásica, ocorrendo a exposição da galactose com a qual a frutalina reage. Devido estas propriedades descritas, poderá representar uma promissora ferramenta em histoquímica e imunologia celular neoplásica.

A frutalina já se mostrou eficiente na identificação de lesões malignas na mama. A marcação em tecidos neoplásicos de mama foi predominantemente membranar, apresentando menor intensidade no citoplasma, porém com um aumento da intensidade citoplasmática a medida que aumenta a progressão tumoral. Não houve marcação de tecido normal ou estroma. A marcação de carcinoma *in situ* foi intensa e houve um aumento progressivo da intensidade de marcação das lesões menos para as mais agressivas (FERREIRA, 2001).

Milhome (2003), utilizou a frutalina no estudo do câncer de tireóide humana e concluiu que a frutalina é um excelente marcador para diferenciação de células malignas e benignas em lesões da tireóide, com marcação semelhante a galectina 3.

Ainda não existem relatos de trabalhos com a utilização da frutalina nos LH ou em qualquer outra doença linfoproliferativa.

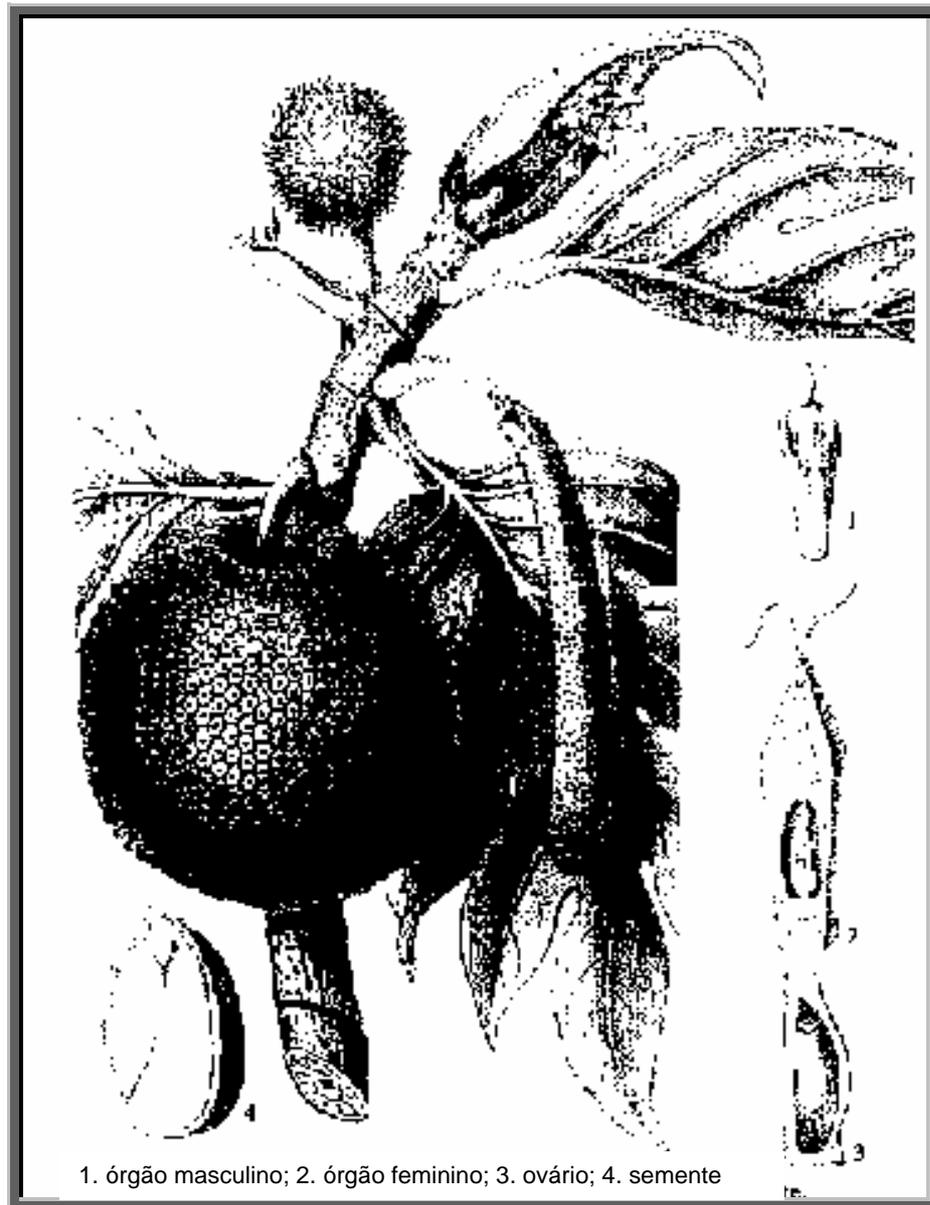


Figura 1 - Fruta-pão (*Artocarpus incisa*)

2.3 Linfoma de Hodgkin

O Linfoma de Hodgkin (LH) é uma doença linfoproliferativa caracterizada histopatologicamente pela presença de células malignas denominadas de Reed-Sternberg (RS) associadas a fundo celular característico constituído de células inflamatórias não neoplásicas e células acessórias (BANKS,1995).

Devido à maneira particular do LH de compartilhar características comuns a doenças malignas, inflamatórias crônicas e a distúrbios imunológicos, desde o seu

conhecimento foi tema de imensos debates e discussões. A coexistência freqüente de tuberculose, ou outra doença infecciosa, e seu curso febril eram os argumentos usados pelos autores que defendiam o LH como uma forma de infecção granulomatosa crônica ou uma doença em um grau intermediário entre a tuberculose e o câncer (MACEDO, 1989). A natureza maligna da doença só foi aceita em 1967 quando Seif e Spriggs confirmaram a origem clonal da célula maligna pela análise citogenética (*apud* LINK; DONALDSON, 1993). Desde então intensa investigação em busca da origem da célula RS tem sido feita, porém devido a sua escassez nos tecidos, pois representa apenas 1% do total celular no tumor, e seu comportamento e fenótipo heterogêneo, muito se discute em relação a sua origem e função.

Inicialmente, postulou-se que pudessem ser o resultado da fusão entre linfócitos e células reticulares (WARNER *apud* HALUSKA; BRUFISKY; CANELLOS, 1994) ou mesmo entre linfócitos (SINKIVCS *apud* HALUSKA; BRUFISKY; CANELLOS, 1994). Mais tarde, tais células tiveram sua origem relacionada a diferentes tipos celulares, como macrófagos ou histiócitos, células reticulares interdigitantes, dendríticas ou granulócitos (HALUSKA; BRUFISKY; CANELLOS, 1994; SAID, 1992). As suspeitas de origem de células B iniciaram com o relato da produção de antígenos específicos de linfócitos B, como a cadeia J (POPPEMA, 1992) e a tendência do LH predominância linfocitária variante nodular em progredir para LNH B difuso de grandes células em até 10% dos casos (MENESTRINA; CHILOSI; SCARPA, 1995).

O progenitor celular das células RS, foi finalmente determinado quando o rearranjo clonal do gen da imunoglobulina (Ig) foi amplificado de uma célula RS micromanipulada, provando a malignidade da doença. Estudos moleculares das células RS mostram que essas células são uma população clonal de linfócito B com imunoglobulina mutada no gene da região variável (*V genes*). As mutações somáticas são introduzidas dentro do rearranjo V genes da célula B participando da resposta imune dentro do centro germinativo transformado. As mutações somáticas no gen das Igs seriam introduzidas durante o desenvolvimento das células B, confirmando então a origem B das células RS (BRÄUNINGER et al., 1999; THOMAS et al., 2004). Outros autores, baseados em resultados de novas técnicas de imunofenotipagem e biologia molecular, apóiam a tese da origem linfóide B das células RS (WRIGHT et al. 1994; HALUSKA; BRUFISKY; CANELLOS, 1994;

HUMMEL et al., 1995; BASIC-JUKICI et al., 2001). Alguns estudos relatam que, em raros casos de LH forma clássica, as células RS e variantes podem ser derivadas de população clonal de células T (HANSMANN; WILLENBROCK, 2002; SEITZ et al., 2000).

Vários relatos sugerem a transcrição do fator NF κ B, como efeito central da transformação maligna do LH, e o vírus Epstein Barr (EBV) tem tido importante papel neste mecanismo principalmente na ativação do NF κ B. Alterações genéticas podem levar também a ativação do NF κ B e inativação da via FAS do mecanismo de apoptose (THOMAS et al., 2004).

Este reconhecimento de que a célula RS é um linfócito B do centro germinativo do gânglio linfático, estabeleceu esta patologia, antes mais comumente chamada de Doença de Hodgkin (DH), como um linfoma de células B. Por este motivo, os patologistas que propuseram a classificação histopatológica da Organização Mundial de Saúde (OMS), preferiram mudar a designação da Doença para Linfoma de Hodgkin. Entretanto em uma reunião com o Comitê de Aconselhamento Clínico, a maioria dos clínicos expressou a opinião de que as características clínicas e a abordagem terapêutica peculiar justificam a manutenção do termo DH. Por conseguinte ambas as formas permanecem em uso, mas há uma tendência a favor do termo LH (SPECTOR, 2004).

O LH tem a incidência mundial de aproximadamente 62000 casos por ano (PARKIN, et al, 2005) e 7400 casos por ano nos Estados Unidos (EUA) (JEMAL, et al, 2005). Nos EUA é o tipo de neoplasia mais comum na faixa etária de 15 a 19 anos, correspondendo a 16% de todos os casos de câncer diagnosticado (HUDSON; DONALDSON, 2002).

A distribuição de faixa etária, no LH, é caracteristicamente bimodal e varia consideravelmente com a região geográfica, situação econômica e etnia. Nos países desenvolvidos, o primeiro pico ocorre por volta dos 25 anos e o segundo pico após os 50 anos. Nos países em desenvolvimento o primeiro pico ocorre antes da adolescência (HUDSON;DONALDSON, 2002). Estudos epidemiológicos mostram claramente três formas distintas de LH: forma infantil (pacientes menores de 14 anos), forma adulta jovem (pacientes de 15 a 34 anos) e a forma do idoso (pacientes de 55 a 74 anos). Existe uma leve predominância de incidência no sexo masculino,

sendo mais marcante esta diferença na forma infantil, e a presença de LH em negros é rara. A incidência de novos casos permaneceu estável nas últimas cinco décadas, enquanto a mortalidade foi reduzida em mais de 60% desde o início dos anos 70 devido aos avanços terapêuticos (BIGNI, 2005). Apesar de ser considerada uma doença relativamente rara, o LH é uma das seis neoplasias mais comuns em adultos jovens (MARRET et al., 2002).

Atualmente o LH ainda é motivo de intenso estudo principalmente em relação a sua etiologia, que há 170 anos permanece controversa, e definição de fatores prognósticos. Múltiplos fatores como infecção, imunossupressão (genética ou adquirida) e suscetibilidade genética podem justificar em parte o aparecimento do LH. Relatos de surtos de LH em adolescentes e adultos jovens em 1970, sugeriu que agentes infecciosos causaram ou contribuíram para o aparecimento da doença (EKSTRAND; HORMING, 2002).

Com as evidências epidemiológicas e estudos sorológicos mostrando uma forte concordância entre infecção pelo Vírus Epstein Barr (EBV) e a incidência de LH, este agente surgiu como principal candidato à agente etiológico. Estudos mais recentes utilizando técnicas mais sensíveis e específicas como hibridização *in situ* (HIS), que detecta o código viral na célula, e imunohistoquímica com membrana protéica latente 1 (LMP1), confirmaram esta tendência. O processo de carcinogênese promovido pelo EBV pode ser justificado através de promoção, pelas proteínas virais, de instabilidade genética e alteração no processo normal de apoptose da célula. Também existem evidências atuais que o EBV induz a ativação da deaminase que é uma enzima responsável pela hipermutação somática nas células B do centro germinativo (MEYER; AMBINDER; STROOBANTS, 2004). Produtos gênicos virais podem ser encontrados em cerca de 50% dos casos e esta associação é significativamente mais forte em casos de LH tipo histológico celularidade mista (LHCM), sendo também maior em pacientes de países em desenvolvimento, imunossuprimidos e em crianças menores de 10 anos (PINTO, 2003; EKSTRAND; HORMING, 2002; ZOU et al., 2001). Pinto em 2003 confirmou estes dados através de um estudo comparativo entre a expressão de EBV em casos de LH do Brasil e da França, com larga predominância de expressão viral nos casos brasileiros e de subtipo LHCM. Reforçando esta hipótese, outro estudo brasileiro realizado com a população da cidade do Rio de Janeiro, região sudeste do Brasil,

mostrou que o vírus EBV foi encontrado em 55% dos casos estudados e sua presença correlacionou-se de maneira significativa com o subtipo histológico LHCM (OR = 9; IC 95% = 1,66 - 66; p = 0,0015) (LOUREIRO et al, 2004).

A hipótese de predisposição genética foi inicialmente levantada devido a maior incidência da doença entre parentes de portadores de LH, principalmente do mesmo sexo, e gêmeos, principalmente univitelinos. O risco de concordância para LH em gêmeos univitelinos, aumenta 100 vezes, enquanto nos dizigóticos este aumento não é visto (THOMAS et al., 2004; EKSTRAND; HORMING, 2002; HUDSON; DONALDSON; 2002; BJÖRKHOLM et al., 1977). Estudos em famílias afetadas tem mostrando associação da LH com antígenos de histocompatibilidade (HUDSON; DONALDSON, 2002). Imunodeficiência adquirida ou genética também é motivo de investigação para justificar a etiologia do LH.

Pacientes com LH não tratados, mesmo em estadios localizados, exibem um defeito imunológico caracterizado por uma acentuada redução da imunidade celular, enquanto que imunidade humoral permanece inalterada. Estes pacientes apresentam uma elevada susceptibilidade às infecções com germes oportunistas e a tuberculose. As alterações imunológicas associadas à imunossupressão induzida pelo tratamento persistem mesmo nos pacientes em remissão contínua completa de longa duração. O mecanismo que leva a uma resposta imunológica alterada parece ser complexo, sua origem é desconhecida e não sabemos se está relacionado à patogênese da doença (MACEDO, 1990). Os estudos mostram claramente que LH é uma doença de etiologia heterogênea e que estudos adicionais ainda são necessários para elucidar as diferenças geográficas, de faixa etária e mudanças de incidência dos subtipos histológicos em determinados períodos (CARTWRIGHT, 2004).

Cerca de 90% dos casos de LH se apresentam clinicamente como adenomegalia, raramente dolorosa, de consistência elástica, com evolução de dias a meses e seu tamanho pode flutuar de forma traiçoeira. Nódulos cervicais estarão envolvidos em 60 a 80% dos casos e 60% dos casos também terão envolvimento mediastinal. Gânglios axilares, inguinais, retroperitoniais podem estar envolvidos, porém em uma porcentagem menor de pacientes. Envolvimento esplênico ocorre em 26% dos pacientes, em 13% dos casos é o único sítio subdiafragmático de doença e a frequência varia com o tipo histológico, sendo mais comum no tipo depleção

linfocitária (83%) seguido do tipo celularidade mista (59%). Sintomas sistêmicos como febre, anorexia, perda de peso, fadiga, náuseas e prurido estão presentes em 30% dos pacientes. Curiosamente alguns pacientes relatam dor em áreas acometidas pelo LH logo após a ingestão de álcool. Envolvimento pulmonar é relatado em 17% dos casos e sempre associado à doença mediastinal ou hilar. Outros sítios menos comuns são ossos (2%), medula óssea (5%) e fígado (2%) (LANZKOWSKY et al., 2000).

O estadiamento dos pacientes com LH adquire uma grande importância já que o tipo e a intensidade do tratamento serão determinados pela extensão da doença. O estadiamento clínico-patológico sistemático foi estabelecido na famosa conferência de Ann Arbor, em 1971 (CARBONE; KAPLAN, 1971). Em 1988, no encontro de Cotswolds, foi reconhecido que além do estadiamento já estabelecido em Ann Arbor, pacientes que tinham doença “bulky” (definida como um único linfonodo com 10 cm ou mais ou massa mediastinal maior que um terço do diâmetro do tórax) tinham pior prognóstico (EKSTRAND; HORMING, 2002). A revisão do estadiamento de Ann Arbor que é utilizada atualmente, está descrita na quadro 1.

Quadro 1 – Classificação modificada de Ann Arbor para estadiamento do Linfoma de Hodgkin

ESTÁGIO	DISTRIBUIÇÃO DA DOENÇA
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 localizado de órgão ou tecido extralinfático contíguo (II _E).
III	Comprometimento de regiões ganglionares em ambos os lados do diafragma (III), o que pode 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, tecidos extralinfáticos, com ou sem comprometimento linfático.
Subclassificações: A – sem sintomas B – febre, perda de peso, sudorese noturna X – Doença Bulky E – envolvimento de um único sítio extranodal, contíguo ou próximo a um sítio de doença	

Fonte: CARBONE, P. P.; KAPLAN, H. S.; MUSSHOF, K.; SMITHERS, D. W.; TUBIANA, M. Report of committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res.*, v. 31, n. 1, p. 1860-1867, 1971.

Os estádios IA, IB e IIA são definidos, para fim de planejamento de tratamento e previsão de prognóstico, como doença localizada, enquanto os estádios IIB a IV, representam doença avançada. Em nossos meio, 70% a 80% dos pacientes apresentam-se com doença avançada (SPECTOR, 1993; VASSALLO et al., 2001).

O diagnóstico de LH depende da presença no material de biopsia das células RS ou suas variantes. Histologicamente a célula RS clássica tem aproximadamente 20 a 50 micrômetros ou mais em diâmetro, ou seja, é uma célula

grande, com as duas metades freqüentemente parecendo imagens especulares, geralmente apresentam acentuada acidofilia ou citoplasma ligeiramente basofílico, sendo o núcleo multilobado, bi ou multinucleado, apresentando macronúcleos eosinofílicos semelhantes a inclusões, em "olho de coruja" (Figura 2). Tipicamente a membrana nuclear mostra-se espessada e cromatina ausente em volta do nucléolo formando um halo perinucleolar (STEIN, et al., 2001).

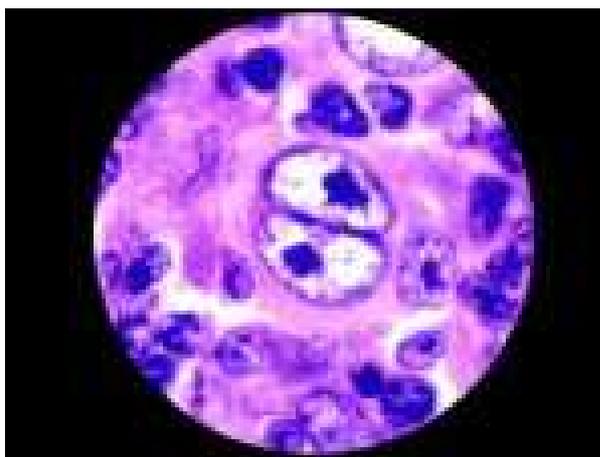


Figura 2 - Célula Reed Sternberg

As variantes da célula de Reed-Sternberg incluem as mononucleares, a multilobada com núcleos polipóides semelhantes à pipoca ("pop-corn") própria do subtipo Predominância Linfocítica (variante linfocítica-histiocítica – células L & H) e a variante lacunar, observada predominantemente no subtipo Esclerose Nodular onde apresentam núcleo dobrado ou multilobulado situado dentro de um espaço claro criado pela retração do citoplasma durante o processamento histológico (STEIN et al., 2001).

A célula RS é evidenciada em todos os tipos histológicos da doença e atua como um fator diferenciador do LH para os outros tipos de linfoma. Células RS-like podem ser encontradas em algumas condições infecciosas como a mononucleose infecciosa (ADDIS; ISAACSON, 1986; BURKE, 1992; PAES ; CABEÇADAS, 1999) e neoplásicas tais como linfomas T, linfoma B rico em célula T, linfomas anaplásicos, micose fungóide e adenopatias reacionais (ABREU, 1997; PAES; CABEÇADAS, 1999). Células de morfologia semelhante a células RS foram também identificadas em linfonodos de pacientes apresentando Leishmaniose

visceral e tuberculose (FERREIRA; OLIVEIRA; ALENCAR , 1977). Dessa forma, para a confirmação do diagnóstico deve ser considerado, além da presença das células RS, a associação com infiltrado celular não neoplásico como linfócitos maduros, plasmócitos, histiócitos, eosinófilos e polimorfonucleares, além da relativamente freqüente presença de necrose, e a realização da imunohistoquímica do material.

A classificação histopatológica do LH foi recentemente revista pelo comitê de patologistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) responsáveis pela classificação das doenças neoplásicas dos tecidos hematopoiéticos (Quadro 2) (STEIN et al., 2001). A principal modificação foi a identificação de um subtipo histopatológico peculiar, denominado “Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular” (LHPLN), que difere das outras formas do LH, chamadas de clássicas (LHc), em diversos aspectos: morfologia, imunofenótipo, transcrição de imunoglobulinas das células neoplásicas e composição do infiltrado ao redor (STEIN et al., 2001; CHAN, 2001; EKSTRAND; HORMING, 2002). Embora todos os tipos de LH pareçam ser derivados de alterações clonais de células B do centro germinativo, biologicamente o LHPLN difere do LHc nos tipos de mutações somáticas (HANSMANN; WILLENBROCK, 2002).

Hansmann e Willenbrock (2002) sugerem que no futuro, os LH devam ser classificados também pelos mecanismos de transformação neoplásica, ainda desconhecidos, complementando os atuais critérios morfológicos e de fenotipagem.

Quadro 2 - Classificação da OMS para LH (2001)

- Linfoma de Hodgkin nodular com predomínio de linfócitos.
- Linfoma de Hodgkin clássico:
 - Esclerose nodular (tipo 1 e 2);
 - Celularidade mista;
 - Depleção de linfócitos;
 - Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos.

Fonte: Pathology and genetics tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. World Organization Classification of Tumors. IARC Press; Lyon 2001. Chapt 8.

O LHPLN representa aproximadamente 5% de todos os casos de LH. Os pacientes são predominantemente do sexo masculino e com idade entre 30 e 50 anos. A apresentação clínica mais comum é linfadenopatia periférica localizada (estádio I ou II). Apenas 5 a 20% dos pacientes apresentam doença avançada. O curso é indolente. A arquitetura linfonodal é totalmente ou parcialmente substituída por infiltrado difuso composto por: pequenos linfócitos e histiócitos. O tipo celular mais característico é o L&H (STEIN et al., 2001). A LHNPL apresenta semelhanças substanciais com os linfomas foliculares, e suas características justificam uma abordagem terapêutica específica (SPECTOR, 2004).

As outras quatro formas histopatológicas compõem o chamado LHc. A forma esclerose nodular e a celularidade mista respondem por aproximadamente 90% dos casos de LHc.

O subtipo Esclerose Nodular (LHEN) é o mais freqüente nos países desenvolvidos em adultos, constituindo aproximadamente 60 % dos casos, sendo mais comum em mulheres e adultos jovens. Morfologicamente caracteriza-se pela presença de nódulos circunscritos, mais ou menos bem delimitados por colágeno, birrefringente, quando examinado à luz polarizada e pela presença da variante lacunar da célula RS. A fibrose pode ser escassa ou abundante e as células neoplásicas são observadas numa base de pequenos linfócitos T, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos. Focos de necrose podem estar presentes, assim como as chamadas "células múmias" (degeneradas ou mortas) (STEIN, 2001).

O subtipo Celularidade Mista (LHCM) é o subtipo predominante em regiões subdesenvolvidas (CHANG et al., 1993; Levy, 1988), incluindo o Ceará (FERREIRA et al., 1977; PITOMBEIRA et al., 1987), sendo responsável por apenas 25% dos casos nos Estados Unidos da América (EUA) e sendo mais comum em homens. Estudos feitos por Abreu et al. (1997) demonstraram que, em crianças e adolescentes no estado do Ceará, a forma LHCM é predominante correspondendo a 64,70%. Tal subtipo é caracterizado por células RS espalhadas em fundo celular inflamatório misto o qual apaga a arquitetura linfonodal. Fibrose intersticial pode estar presente não sendo vistas bandas largas de colágeno como no tipo Esclerose Nodular (STEIN, 2001).

Estudos mais recentes realizados em vários estados do Brasil, começam a mostrar uma diminuição da freqüência do subtipo LHCM e aumento dos casos de

LHEN. Pinto (2003) analisou 66 pacientes do estado do Ceará, e o subtipo mais comum foi o LHEN (57,5%), seguido pelo subtipo LHCM (37,8%). Vassalo et al. (2005) analisaram 1025 casos provenientes do estado de São Paulo. Nesse estudo, 69,2% dos casos tinham o diagnóstico de LHEN e 21,1% dos casos tinham o diagnóstico de LHCM.

Linfoma de Hodgkin Clássico Rico em Linfócitos (LHRL) é um subtipo caracterizado por escassas células RS espalhadas ou em nódulos associado a fundo celular difuso caracterizado por abundância de pequenos linfócitos. Observa-se ausência de neutrófilos e eosinófilos, e de bandas de colágeno, como aquelas encontradas no LHEN. Corresponde a 5% de todos os LH, a média de idade dos pacientes é mais alta que dos outros subtipos e 70% dos pacientes são do sexo masculino (STEIN et al, 2001).

Existe um tipo não usual de envolvimento de linfonodos pelo LHc, não descrito pela classificação da OMS, chamado de Interfolicular (LHIN). O LHIN é caracterizado por uma intensa hiperplasia folicular reativa acompanhada do envolvimento das zonas interfoliculares pelo LH. Em alguns casos pode ser diagnosticado erroneamente como uma das muitas causas de hiperplasia folicular reativa. É considerada como uma possível forma inicial de LHc, que pode evoluir tanto para LHCM quanto para LHEN (DOOGET; COLBY; DORFMAN, 1983).

O LH do tipo Depleção Linfocitária (LHDL) ocorre em menos de 5% dos casos de LH, e apresenta duas subcategorias: fibrose difusa e forma reticular. A incidência tem diminuído nos últimos anos. Alguns estudos mostram casos antes descritos como LHDL sendo agora reclassificados como Linfoma não Hodgkin (LNH) (KANT et al., 1986). A média de idade é de aproximadamente 37 anos e 75 % dos pacientes, são do sexo masculino. Cerca de 70% dos casos estão associados com estágios avançados e 80% com sintomas B. Esse subtipo está muito associado com infecção pelo HIV e é mais visto nos países em desenvolvimento. (NEIMAN; ROSEN; LUKES, 1973; BEARMAN et al, 1978, STEIN et al., 2001).

Algumas correlações clínico-patológicas têm relevância clínica (Quadro 3) e existem diferenças de incidência dos tipos histológicos geograficamente de acordo com o grau de desenvolvimento da região, situação socioeconômica do paciente e positividade para o EBV, mas todas as formas da LHc são abordadas terapêuticamente de maneira idêntica.

Quadro 3 - Correlações clínico-patológicas dos LHc

Esclerose nodular	adolescentes e adultos jovens, sexo feminino, gânglios cervicais supraclaviculares e mediastinais.
Celularidade mista	crianças e idosos, doença avançada, sintomas B.
Depleção linfocítica	rara, idosos, doença avançada, ausência de envolvimento de gânglios periféricos.

Fonte: Spector, N. Abordagem atual dos pacientes com doença de Hodgkin. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 26, n. 1, p. 3, 2004.

Alguns estudiosos questionam se diante de tantas diferenças, realmente podemos considerar o LHc como uma entidade única. Levy et al. (2002) avaliaram esta questão através de um estudo de coorte, clinicopatológico, retrospectivo realizado em Israel. Os autores concordam que, em situações de estadiamento e critérios clínicos de prognósticos iguais, a resposta ao tratamento é uniforme, e que igualmente não existe diferença em termos de sobrevida entre os quatro tipos histológicos. Por outro lado, reconhecem também que LHEN, LHCM e LHDL são entidades biológicas diferentes em relação à distribuição por idade, sexo, expressão de produtos gênicos e de vários antígenos incluindo CD15, CD30, LMP1, p53 e mdm2. Os autores concluem que as alterações biológicas são significativas e que os quatro tipos histológicos não podem simplesmente ser reunidos como uma única entidade.

O estudo imunohistoquímico no LH tem contribuído na aquisição de novos conhecimentos sobre a natureza, diagnóstico e classificação da doença. Como os anticorpos utilizados são inespecíficos para as células RS e suas variantes, e mostram positividade muito variável, torna-se necessário o estudo em conjunto na forma de painel (VON WASIELEWSKI et al., 1997).

As formas clássicas do LH têm imunofenótipo característico: CD15+, CD30+, CD20-, CD45- (HARRIS et al, 1999).

O CD 15 reconhece um antígeno presente nas células mielomonocíticas, lacto-N-fucopentose III (também conhecido como hapteno X). Este antígeno está presente em mais de 90% dos granulócitos incluindo neutrófilos e eosinófilos, e em menor números nos monócitos. Quando a técnica de imunohistoquímica é ideal, principalmente em relação à recuperação antigênica, as células RS e suas variantes apresentam uma positividade alta para o CD 15 (de 82 a 89%) (VON WASIELEWSKI et al, 1997; ARBER, WEISS, 1993; AGNARSONB, KADIN, 1989; ENBLAD, SUNDSTROM, GLIMERLIUS, 1993; CHITTAL, CAVERIVIERE, SCHHWARTING, 1988) (tabela 1). Em contraste menos, de 10% dos casos de LHPLN expressam CD 15 (ARBER; WEISSE, 1993).

O antígeno Ki-1 (CD 30) reconhece uma glicoproteína transmembrana de cadeia única que parece ser homóloga ao fator de necrose tumoral. É expresso primariamente em linfócitos podendo ser encontrado ocasionalmente em macrófagos, sendo positivo nas células RS e suas variantes em aproximadamente 90% dos casos de LHc (SCHMID et al., 1991; ENBLAD; SUNDSTRON; GLIMERLIUS, 1993; VON WASIELEWSKI et al, 1997) (tabela 2).

O CD 20 é o melhor e mais usado pan B, altamente específico e sensível. De acordo com a literatura, a freqüência de expressão esperada nas células RS e variantes é em torno de 5% (VON WASIELEWSKI et al., 1997) a 20% (TZANKOV et al.). Porém alguns autores relatam expressão de pelo menos um antígeno B em até 80% dos LHc (SCHMID et al., 1991; WATANABE et al., 2000).

Tabela 1 - Frequência da expressão pelo CD15 nas células RS e variantes, segundo o subtipo histológico

Subtipo histológico do LHC	Total	Positividade pelo CD15	
		N	%
LHEN	566	501	89
LHCM	387	330	91
LHDL	68	60	82
Outros	47	37	82

Fonte : ARBER, WEISS. CD 15: A review. Appl Immunohistochem 1:17-30,1993.

Tabela 2 - Frequência da expressão pelo CD30 nas células RS e variantes, segundo o subtipo histológico

Subtipo histológico do LHC	Total	Positividade pelo CD30	
		N	%
LHEN	361	318	88
LHCM	281	257	91
LHDL	27	31	87
Outros	45	40	89

Fonte: CHANG KL, ARBER DA, WEISS LM. CD30: A review. Appl Immunohistochem 1:244-255, 1993.

Von Wasielewski et al. (1997) realizaram um estudo retrospectivo sobre o impacto clínico do imunofenótipo no LHC em 1286 pacientes do Grupo de Estudo Alemão do Linfoma de Hodgkin (GHSG), e mostrou que 83% dos casos estudados apresentavam este imunofenótipo característico (CD15+, CD20- e CD30+), 12% perdiam positividade ao CD15 (CD15-, CD20+ e CD30+) e 5% apresentavam outras

combinações. Este estudo conclui que, o melhor painel de anticorpos monoclonais para ser aplicado no estudo dos LHc, deve incluir o CD30, associado à pelo menos o CD15 e um marcador confiável para células B. Casos com perda da expressão do CD30 e com expressão de CD20 associada ou não a perda de expressão do CD15, devem ser submetidos a uma análise imunohistoquímica mais detalhada com associação de outros marcadores.

Células L&H presentes no subtipo isolado de LHPLN mostram fenótipo distinto da célula do LHc. (ARBER et al, 1993; BORING; SQUIRES; TONG, 1993; CHANG et al, 1993). Elas são caracteristicamente positivas para marcadores de linfócitos B, padrão membrana: CD19, CD 20, CD74, CD w75. Em contraste com as células RS e variantes, as células L&H são positivas para Antígeno Leucocitário Comum (LCA-CD 45) e freqüentemente também para o antígeno de membrana epitelial (EMA). A célula L&H é, em geral, negativa para CD 15 e CD30 (CHU et al, 2000).

Quadro 4 - Imunofenótipo do LH de acordo com o subtipo histológico

MARCADOR ANTIGÊNICO	SUBTIPO HISTOLÓGICO	
	LHPL	LHc
CD15 (Leu-M1)	-	+/-
CD30 (Ber-H2)	-	+
CD45 (LCA)	+	-
CD 20 (L26)	+	-/+
EMA	+	-
EBV	-	+
Células T CD57	+	-

Fonte: Stein et al. Hodgkin's Lymphoma. In: Pathology and genetics tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. World Organization Classification of Tumors. IARC Press; Lyon, 2001.Chapt 8.

Além do estadiamento clínico, classificação histopatológica e do fenótipo, estudos e revisões realizados no decorrer dos anos mostraram que outros fatores prognósticos adquirem importância no manejo do paciente com LH. Existe uma dificuldade em uniformizar estes sistemas de prognóstico apesar da criação de vários índices com este objetivo. A primeira dificuldade é a falta de uniformidade biológica da doença, já que pacientes considerados de baixo risco não respondem aos mesmos fatores de mau prognóstico que os pacientes considerados de alto risco, havendo assim a necessidade de pelo menos dois sistemas de escore prognóstico distintos. Este fato estimula a pesquisa de novos marcadores biológicos que permitam aumentar o poder discriminador do escore prognóstico. Organização Européia para a Pesquisa e Tratamento do Câncer (EORTC) (CARDE et al., 1993) e o Grupo de Estudo Alemão do Linfoma de Hodgkin (GHSG) (SIEBER, ENGERT, DIEHL, 2000) identificaram fatores indicativos de bom prognóstico semelhantes em pacientes com doença localizada (Quadro 5).

Quadro 5 - Fatores indicativos de bom prognóstico no LH localizado

EORTC	GHSG
Ausência de grande massa mediastinal	Ausência de grande massa mediastinal
VHS<50 e sem sintomas B	VHS<50 e sem sintomas B
VHS<30 com sintomas B	VHS<30 com sintomas B
Idade <50 anos	Nenhuma doença extraganglionar
No máximo 3 áreas ganglionares	No máximo 2 áreas ganglionares Ausência de envolvimento esplênico difuso ou mais de 5 lesões focais

EORTC – European Organization for Research and Treatment of Cancer

GHSG – German Hodgkin's Lymphoma Study Group

Sintomas B – febre, perda de peso e sudorese noturna

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

Para os pacientes com doença avançada, diversos critérios prognósticos foram propostos, construídos a partir de pequenas séries de pacientes. Recentemente um escore prognóstico foi desenvolvido com base em mais de cinco mil pacientes registrados no Banco de Dados Internacional de Doença de Hodgkin (HASENCLEVER; DIEHL, 1998). Sete fatores adversos foram identificados com um impacto prognóstico semelhante: a presença de cada fator reduz em aproximadamente 8% o tempo de sobrevida livre de progressão da doença em cinco anos (Quadro 6).

Quadro 6 - Fatores indicativos de prognóstico desfavorável no LH avançado de acordo com o escore prognóstico internacional (IPS)

- **Idade \geq 45 anos**
- **Linfócitos $<$ 600/mm**
- **Estádio IV**
- **Albumina $<$ 4 g/dl**
- **Sexo masculino**
- **Hemoglobina $<$ 10,5 g/dl**
- **Leucócitos \geq 15.000/mm**

Fonte: Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med 1998;339:1.506-1.514

Felizmente grandes avanços têm sido alcançados nas técnicas diagnósticas e atualmente somente a apresentação clínica, estadiamento e morfologia não são critérios suficientes para definição da linhagem celular, diagnóstico, programação do tratamento e prognóstico. As técnicas de citotoquímica, imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular têm colaborado para uma precisão maior do diagnóstico através da definição mais precisa da linhagem celular das neoplasias e previsão do seu comportamento e evolução. Cada vez mais buscamos correlacionar a presença ou ausência de determinadas moléculas e marcadores como confirmação diagnóstica e como critério de prognóstico e sobrevida, na tentativa de avaliar melhor o comportamento biológico da neoplasia e

adequar o tratamento de acordo com sua agressividade, extensão e capacidade metastática, com o objetivo de definir estratégias de tratamento adequadas ao risco e conseqüentemente aumentar a sobrevida sem aumentar a toxicidade relacionada ao tratamento.

Vários estudos tentam correlacionar fatores biológicos, laboratoriais e clínicos com o prognóstico do LH. Os quadros 9,10 e 11 mostram alguns dos fatores já estudados, e suas influências no prognóstico.

Quadro 7 - Fatores morfológicos e biológicos relacionados a prognóstico em LH (Revisão Medline 1970 – 2005)

PARÂMETROS	REFERÊNCIAS
Subtipo histológico (LHEN II)	Wijlhuizen et al, 1989*; Ferry et al, 1993**; Dickman et al, 2003**; Pracchia et al, 2005*
Eosinofilia no histopatológico	Tóth, Dworak e Sugar, 1977**
Angiogênese (aumento da densidade microvascular e área total vascular)	Korkolopoulou et al, 2005**
Aumento do nº de macrófagos e histiócitos no material da biopsia	Coppleson et al, 1973**; Colby et al, 1981**; Ree & Kadin, 1985**
CD20 +	Tzankov et al, 2003***; Portlock et al, 2004**
CD15 -	Petrella et al., 1989***; Von Wasielewski et al, 1997**; Benharroch et al, 2000**
CD44v6	Anwar et al., 2000**
P53 +	Brink et al, 1998***; Smolewisk et al, 2000; Montalbán et al, 2004**, Sup et al., 2005*
LMP1 +	Glavina-Dourdov et al, 2001***; Vassallo et al, 2003***; Flavell et al, 2003***
Topoisomerasell	Provencio, 2003**
Bclx	Montalbán et al, 2004**
Bcl2	Brink et al, 1998**, Sup et al., 2005**
TUNEL	Montalbán et al, 2004**
MMP2 e MMP9	Hazar et al, 2004*; Kuittinen et al, 2002***
sIL2	Wieland et al, 2003**
sIL6	Kurzrock et al, 1993**; Seymour et al, 1997**
IL9	Ficher et al, 2003**
IL10	Salgami et al, 2002**
IL6	Reynolds et al , 2002**
Nº de Linfócitos T citotóxico ativados	Younes, 1997**; Oudejans et al, 1997**, Ten Berg et al, 2001**; Camilleri-Broët et al, 2004**; Alvaro et al., 2005**
TARC (CC thymus e activation related- chemokine)	Weihrauch et al, 2005**

*sem valor prognóstico independente

**fator prognóstico negativo independente

***fator prognóstico positivo independente

Quadro 8 - Parâmetros clínicos relacionados ao prognóstico em LH (Revisão Medline 1993-2005)

PARÂMETROS	REFERÊNCIAS
Idade > 45 anos	Hasenclever e Diehl, 1998**; Smolewski et al,2000**; Low et al, 2003**; NG et al, 2004** ,Sup et al., 2005**, Gisselbrecht et al, 2005**
Sexo masculino	Hasenclever e Diehl, 1998**; Smith et al, 2003**, Gisselbrecht et al, 2005**
Sintomas B	Dickemann et al., 2003** Gisselbrecht et al, 2005**
Estadiamento avançado de Ann Bour (IIB, IIIA,IIIB,IVA,IVB)	Hasenclever e Diehl, 1998**; Dieckmann et al, 2003**; Smith et al, 2003** Sup et al., 2005**
Doença “Bulky”	Dieckman et al, 2003**; Smith et al, 2003**
IPS	Hasenclever e Diehl, 1998**
Nº de sítios linfonodais envolvidos (>3)	VassilaKapoulos et al, 2001**
Envolvimento de sítios extranodais	Gisselbrecht et al, 2005**

*sem valor prognóstico independente

**fator prognóstico negativo independente

***fator prognóstico positivo independente

**Quadro 9 - Parâmetros laboratoriais relacionados ao prognóstico em LH
(Revisão Medline 1993-2005)**

PARÂMETROS	REFERÊNCIAS
Nº de Leucócitos (leucócitos > 15000/mm ³)	Hasenclever e Diehl, 1998**; Smith et al, 2003**
Linfopenia (< 600/ mm ³)	Hasenclever e Diehl, 1998**; Low et al, 2003*; Ayoub et al, 1999*
Hipoalbuminemia	Hasenclever e Diehl, 1998**; Low et al, 2003**
PCR aumentado	Wieland et al, 2003**
β2 microglobulina aumentada	Chronowski, 2002**; VassilaKapoulos et al, 2002*; Raida et al, 2002**;

*sem valor prognóstico independente

**fator prognóstico negativo independente

***fator prognóstico positivo independente

2.4 Lectinas e Linfoma de Hodgkin

Existem poucos estudos publicados utilizando lectinas em LH e a maioria é da década de 80. Neste período era intensa a busca em relação à origem das células RS e existiam hipóteses de serem derivadas de histiócitos, células T ou B transformadas ou células reticulares dendríticas. Estudos realizados nesta época confirmavam a origem B das células RS e suas variantes pela demonstração de IgG de superfície ou citoplasmática por imunistoquímica ou imunofluorescência. Porém a natureza policlonal da imunoglobulina sugeria que esta não era produto de síntese celular, mas resultado de internalização de IgG exógena ou fagocitose de imunocomplexo. Esta habilidade das células do LH de ingerir imunocomplexos assim como partícula de látex, células da série vermelha e linfócitos, fez aumentar a curiosidade da possibilidade da origem histicocítica das células tumorais. Muitos estudos utilizando lectinas já mostravam a presença de receptores de lectina de plantas em linfócitos transformados, macrófagos e histiócitos e que podiam ser demonstrados em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, sendo

potencialmente úteis como novos marcadores celulares na investigação de doenças linfoproliferativas. Então alguns autores utilizaram as lectinas como ferramentas para reforçar a hipótese da origem macrocítica-histiocítica das células RS, como também na comparação com outros marcadores em estudo na época com CD15, CD30 e CD74, na busca de um marcador específico para o diagnóstico de LH e diagnóstico diferencial com outras patologias em que se encontrava célula RS similares (STRAUCHEN et al., 1984; SARKER et al., 1992).

A lectina vegetal mais estudada em pacientes com LH até o momento foi a PNA (peanut agglutinin). As marcações de positividade variaram de 0 a 100%, de acordo com a técnica utilizada, concentração da lectina no experimento e o número de casos avaliados. Existem estudos com LH e as seguintes lectinas vegetais: Bauhinia purpúrea (BPA), Concanavalina A (Con A) e Asparagus peã (ASP) (*Lotus tetragonolobus*).

Möller em 1982 relatou o uso nos LH da lectina vegetal extraída do amendoim (PNA), uma lectina β D-galactose ligante de *Arachis hypogaea agglutinin*, e demonstrou uma proeminente, constante e característica marcação paranuclear (golgiana) nas células RSH, concluindo que esta lectina poderia ser utilizada como um importante reagente para identificar lesões precoces com número reduzido de células tumorais.

Outra lectina já utilizada com resultados promissores em LH foi a *Bauhinia purpúrea* (BPA). Descrita como: *um novo marcador em parafina para células de Reed Sternberg*, foi utilizada em 33 casos de LH com positividade de marcação nas células RS e suas variantes de 97%. Neste estudo foram encontrados três padrões de marcação: citoplasmático difuso, paranuclear e membranar. Novamente o padrão de marcação paranuclear foi relatado como o mais característico e mais freqüente (SARKER, 1992).

Strauchen et al. (1984) também relataram resultados animadores com o uso da Concanavalina A (Con A) nos LH e positividade em 100% dos casos.

A tabela 3 resume resultados de estudos publicados com o uso de lectinas em LH nos últimos 25 anos.

Tabela 3 - Resultado de estudos utilizando lectinas em LH (Revisão Medline e Lilacs - 1980-2005)

Referência	Lectina	Carboidrato ligante	Nº de casos estudados	Positividade nas células RS e variantes nos LH
Möller, 1982	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	35	100%
Hsu e Jaffe, 1984	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	22	59%
Hsu et al., 1985	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	20	65%
Strauchen, 1984	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	13	Fraca ou ausente
Strauchen, 1984	ASP	L-fucose	13	Fraca ou ausente
Strauchen, 1984	Con A	Manose/glucose	13	100%
Ree et al., 1985	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	145	76%
Ree et al., 1989	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	91	85,7%
Sarker et al., 1992	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	33	69,7%
Sarker et al., 1992	BPA	βgalactose N-acetil- galactosamina	33	97%
Erber et al., 1992	PNA	βgalactose N-acetil- galactosamina	3	0

PNA: Peanut agglutinin (*Arachis hypogaea*), BPA: *Bauhinia purpurea*, Con A: Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*), ASP:- Asparagus pea (*Lotus tetragonolobus*)

Em algumas neoplasias, como o câncer de colo, o papel da marcação pelas lectinas já está bem estabelecido como indicador de prognóstico. Os estudos relacionando o uso das lectinas em LH ao prognóstico, se limitam a avaliar a associação de fatores prognósticos com o número de histiócitos e macrófagos no corte histológico.

Ree e Crowley (1983) estudaram a marcação dos histiócitos e das células RS e variantes em material de biopsia de linfonodos com diagnóstico de LH. Foram descritos dois tipos distintos de marcação citoplasmática: marcação difusa e marcação puntiforme paranuclear. A marcação difusa foi vista na maioria dos histiócitos sem atipia nuclear e ocasionalmente nas células RS, e a marcação paranuclear estava presente nos histiócitos em número variado e em raras células RS. Tumores com o maior número de histiócitos com marcação paranuclear foram vistos mais freqüentemente em pacientes com doença disseminada (69% versus 31%, $p=0,002$), em pacientes com sintoma B (73,8% versus 26,2%, $p=0,001$) e na maioria dos pacientes com o subtipo histológico depleção linfocitária (14/16). Estas observações sugerem que a marcação paranuclear deve representar uma variação anormal dos histiócitos associada com fatores clínicos e histopatológicos desfavorável.

Ree e cols (1985) utilizaram a lectina PNA para detectar macrófagos e histiócitos na rotina de diagnóstico e classificação do LH, já que estas células não são bem detectadas por métodos convencionais, e comparou o esta marcação com fatores prognósticos pré-estabelecidos. Este estudo concluiu que o aumento do número de macrófagos e histiócitos esta fortemente relacionado à presença de sintomas B, assim como a pouca resposta à terapia.

Ree (1986) comparou a marcação de macrófagos-histiócitos pela lectina Con A em biopsia de pacientes com recidiva precoce (menos de 26 meses do diagnóstico) com biopsia de pacientes em remissão completa por no mínimo 48 meses. Três tipos morfológicos de histiócitos foram reconhecidos: tipo A, células de tamanho médio similar àqueles vistos nos folículos reativos, caracterizados por núcleos uniformes e distintos e abundante citoplasma; tipo B, células de vários tamanhos e formas, bordas não definidas e citoplasma escasso; tipo C, células grandes estreladas ou espinhosas. O estudo sugeriu que o predomínio da marcação

histiocitária do tipo B pode ser usada como critério para identificar pacientes com alto risco para recidiva precoce.

Ree (1987) avaliou a variação da marcação de histiócitos pela Con A em 140 pacientes com LH não tratados, 72 sem sintomas B e 68 com sintomas B. Febre foi o sintoma mais comum e estava presente em 57 dos pacientes sintomáticos. A análise dos resultados mostrou associação da febre com o tipo morfológico histiocitário do tipo B e não houve associação da febre com nenhuma outra variável.

Nenhum estudo realizado com LH e lectinas até a presente data se propôs a correlacionar critérios clínicos ou de prognóstico com os padrões de marcação encontrados nas células RS e variantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- ✓ Descrever a marcação pela frutalina nas células de RS e suas variantes.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Correlacionar a marcação pela frutalina biotinilada (Fb) com os subtipos histológicos do LHc;
- ✓ Associar a marcação pela Fb no LHc com critérios prognósticos clínicos:
 - idade;
 - sexo;
 - presença de recidiva;
 - estadiamento clínico de Ann Arbor;
 - sintomas B;
 - resposta ao tratamento.
- ✓ Associar a marcação pela Fb no LHc com o fenótipo:
 - CD15;
 - CD20
 - CD30

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

- Estudo qualitativo, quantitativo e transversal

4.2 Lócus do Estudo

- Laboratório de Lectinas e Bioconjugados do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (LABLEC) em parceria com o Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP)
- Laboratório de Patologia Prof Livino Pinheiro do Hospital do Câncer/Instituto do Câncer do Ceará (LPLP).

4.3 População do Estudo

A partir de análise retrospectiva dos laudos de imunohistoquímica dos arquivos do LPLP, foram selecionados espécimes de biópsia cirúrgica de linfonodos, diagnóstico morfológico e de imunohistoquímica (IHQ) compatíveis com LHc, e sem restrição de faixa etária dos pacientes (Apêndice 1). Os casos foram obtidos de instituição médica filantrópica localizada em Fortaleza-Ceará, o Instituto do Câncer do Ceará (ICC/HC), no período entre janeiro de 1999 e junho de 2005. Em todos os casos o diagnóstico morfológico de LHc e subtipo histológico foram confirmados por dois hematopatologistas após revisão das secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE), de acordo com a classificação da OMS de 2001 para LH (STEIN et al, 2001). Todos os casos selecionados já haviam sido submetidos a IHQ pela técnica peroxidase antiperoxidase avidina biotina (PAP) com recuperação antigênica em microondas (GOWN et al, 1993), incubação de 18 horas, realizada no

momento da avaliação diagnóstica como rotina do laboratório para confirmação do diagnóstico de LHc. Nesta rotina são utilizados os anticorpos monoclonais:

- Anticorpo monoclonal anti-T cell (CD3), clone F7.2.38, catálogo nº M 7254, 1:50, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA.
- Anticorpo monoclonal anti-Granulocyte associated antigen (CD 15), clone C3D-1, catálogo nº M 0733, diluição 1:30, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA.
- Anticorpo monoclonal anti-B cell (CD20), clone L26, catálogo nº M 0755, diluição 1:50, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA.
- Anticorpo monoclonal anti-CD30, clone Ber-H2, catálogo nº M 0751, diluição 1:30, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA.
- Anticorpo monoclonal anti Leucocyte common antigen (CD45), clones 2B 11 + PD7/26, catálogo nº M 0701, diluição 1:50, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA.
- Anticorpo monoclonal anti Epithelial Membrane Antigen (EMA), clone E29, catálogo nº M 0613, diluição 1:50, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA.
- Anticorpo monoclonal anti fascin, clone 55K-2, catálogo nº M 3567, diluição 1:50, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA.

Após a seleção dos casos foi realizada coleta de dados clínicos, laboratoriais e de resposta ao tratamento, seguindo a ficha em anexo (Apêndice 2).

Foram excluídos do estudo pacientes cujo bloco de parafina fosse insuficiente para o estudo ou que a sua utilização comprometesse o armazenamento posterior; pacientes cujo material da biopsia não era de linfonodo; lâminas extraviadas durante o processo de histoquímica (excluídas após tentativas em três baterias); casos em que os dados do prontuário estavam incompletos; e pacientes que não receberam ABVD (Adriplastina, Bleomicina, Vimblastina e Dacarbazina) como esquema terapêutico inicial ou que não realizaram qualquer tratamento no HC/ICC.

4.4 Estudo Clínico

Os dados clínicos, laboratoriais e de resposta ao tratamento, foram obtidos através de revisão de prontuários arquivados no Serviço de arquivo médico e estatístico (SAME) do HC-ICC seguindo a ficha anexa (Apêndice 2). Foram colhidos e analisados os seguintes dados: idade, sexo, presença de recidiva, número e localização de linfonodos acometidos, estadiamento clínico segundo Ann Arbor, presença de sintomas B, doença Bulky mediastinal, infiltração medular ou de outros órgãos pelo LHc, subtipo histológico, laudo de imunohistoquímica (positividade para CD15, CD20, CD30) e resposta clínica inicial ao ABVD. Os dados clínicos serão estratificados de acordo com critérios prognósticos, já estabelecidos pela literatura, para comparação com o resultado da histoquímica com Fb na tentativa de correlacionar padrões de marcação com gravidade da doença e prognóstico. Foram considerados como fator de mau prognóstico: idade > 45 anos, sexo masculino, doença recidivada, doença Bulky mediastinal, acometimento de mais de 3 sítios de linfonodos, doença avançada ao diagnóstico, presença de sintomas B, infiltração extralinfonodal e resposta desfavorável ao tratamento inicial (SMOLEWSKI et al., 2000; ZANDER, WIEDENMANN; WOLF, 2002; GISSELBRECHT et al., 2005). Os estádios IA, IB e IIA são definidos como doença localizada, e como doença avançada os estádios IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB (SPECTOR, 2004). Remissão completa ou resposta favorável foi definida como resolução clínica da doença na avaliação até o quarto ciclo de ABVD; resposta parcial, ausência de resposta ou progressão de doença, foram considerados como resposta desfavorável (SMOLEWSKI et al. 2000).

4.5 Estudo Histoquímico utilizando a Frutalina Biotilizada como Sonda

4.5.1 Preparo e Processamento dos Cortes Histológicos

O material para estudo encontrava-se fixado em formol e incluído em parafina. As condições de cada bloco foram avaliadas verificando-se o estado de

preservação, tamanho da amostra e área da lesão. Foram realizados cortes histológicos na espessura de 3 micrômetros (μm) e fixados em lâminas silanizadas (lâminas de vidro com substância colante para tecido - silano A - 174, SIGMA-ALDRICH, USA).

4.5.2 Frutalina: Isolamento, Purificação e Biotinização

O processo de isolamento, purificação e biotilização da frutalina foram realizados no LABLEC e seguiu as seguintes etapas:

1. A semente

As sementes foram coletadas de frutos maduros de *A. incisa* L. (fruta pão de caroço) provenientes de Maranguape, Estado do Ceará, destegumentadas, desidratadas (CH_3OCH_3 1:2 m/v 6/6 h por 24 h) com acetona e secas ao ar livre.

2. A farinha

A farinha foi obtida pela trituração das sementes livres de tegumento e desidratadas, reduzidas a uma farinha fina (60 mesh), peneirada e acondicionada em frascos fechados, previamente tarados, à temperatura ambiente.

3. O extrato total e fração 0/90

A extração das proteínas foi feita suspendendo-se a farinha em solução de NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v) e deixada em agitação contínua por 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 8.000 x g por 30 min a 4°C em centrífuga SORVAL RC5B Plus. O precipitado (fração 0/90) foi ressuspenso em 20 ml de NaCl 0,15 e o sobrenadante, descartado.

4. Cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana extraída de *Adenantha pavonina* L.

A fração 0/90 foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina* L. (10,0 ml de gel hidratado, montado em coluna de 1,00 cm de diâmetro e 20,0 ml de volume total) obtida segundo Tavares (1998). Um volume de 10,0 ml da fração foi aplicado a coluna, previamente equilibrada com NaCl 0,15 M, a um fluxo constante de 30,0 ml/h mantido por bomba peristáltica (Pump P-1 Pharmacia Biotech). Frações de 3,0 ml foram coletadas (coletor de frações Gradifrac da Pharmacia Biotech). O material não retido (fração P1ft) foi eluído com NaCl 0,15 M. A fração que ficou retida na coluna (fração P2ft) foi eluída com tampão β alanina 0,1 M pH 2,6 em NaCl 0,15 M e consistia essencialmente da lectina pura. A eluição das proteínas foi acompanhada por absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2000 da Pharmacia Biotech. A fração P2 foi dialisada contra H₂O destilada (1:50 v/v, trocas de 8/8h por 48 h), liofilizada (liofilizador Edwards modelo L4KR). Em algumas ocasiões, a fração P2, não dialisada, foi concentrada e armazenada em tubos eppendorf à temperatura de -10°C.

5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -marcaptoetanol

A pureza das preparações da fração P2 (frutalina) foi avaliada por eletroforese em gel de policrilamida em presença de SDS e β -marcaptoetanol. A eletroforese foi feita segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970), utilizando o sistema vertical da Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, EE.UU. A placa foi montada com gel de aplicação a 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCL 0,5 M pH 6,8 e SDS 1,0% e o gel de separação a 15% em tampão Tris-HCL 3 M pH 8,8 e SDS com pH 8,3. Amostras do extrato total e da frutalina (1,00mg) foram dissolvidas em 1,0 ml de tampão Tris-HCL 0,0625 M, pH 6,8, glicerol 5% e SDS 1%, na ausência ou presença de β -marcaptoetanol (1%) e submetida à fervura por 5 minutos. Azul de bromofenol (0,05%) foi adicionado às amostras para controle das corridas eletroforéticas que foram realizadas a 200V, 150 a 200 mA durante aproximadamente 1 hora. Os géis foram corados com solução contendo Coomassie

Brilliant Blue 250 R (0,05%) em metanol: ácido acético glacial: água destilada (1:3:8) e descorado com ácido acético glacial: metanol: água destilada (1:3:8). Os maçadores de massa molecular utilizados foram: albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), citocromo C (12,4 kDa) e inibidor de calicreína (6,6 kDa).

6. Biotilização

A lectina obtida por cromatografia de afinidade foi biotilada. Foi feita uma solução de 1,00 mg de biotina em 1,0 mL de dimetil-sulfóxido (DMSO). A frutalina foi dissolvida em uma solução de D-galactose 200 mM NaCl 150 mM em quantidade suficiente para que a proporção molar lectina:biotina fosse de 1:10. Após misturar as duas soluções, deixou-se em contato por 120 min a 4 °C. Depois deste tempo, a solução foi dialisada contra NaCl 150 mM NaN₃ 15 mM (3x, 12/ 12h). O dialisado foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina* para extração das lectinas biotiladas que preservaram a atividade, sendo eluída com D-galactose 200 mM NaCl 150 mM. A frutalina biotilada assim obtida foi dialisada contra NaCl 150 mM NaN₃ 15 mM (3x, 12/ 12h), aliqüotada em eppendorfs de 500 µL e conservada a 4°C.

4.5.3 Técnica da Histoquímica utilizando Frutalina Biotilada

O estudo histoquímico com o uso da frutalina biotilada como sonda, foi realizado em 54 casos de LHc utilizando a técnica estrepto-avidina-biotina-peroxidase (Strepto-ABC) obedecendo a seguinte seqüência:

1. Preparação dos cortes histológicos na espessura de 3 micrômetros incubados por 60 min a 60°C em laminas silanizadas.

2. Desparafinização:

- ✓ xilol, a temperatura ambiente por 20 min e depois mais 20 min;
- ✓ etanol 100% - 1x 10 min;

- ✓ etanol 95% - 1 x 5min;
 - ✓ etanol 80% - 1 x 5min;
 - ✓ etanol 70% - 1 x 5min.
3. Lavagem das lâminas em água destilada 3x 5 min.
 4. Hidratação durante 20 min em água destilada.
 5. Lavagem em TBS (*Tris Buffered Salina*) com Tween 20– 0,03% 3 x 5min.
 6. Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em metanol P.A. por 10min.
 7. Lavagem com TBS 3x / 5min.
 8. Incubação em câmara úmida com soro normal de coelho (SC) 1:5 (1 SC + 4 TRIS-HCL), durante 15 min, e depois retirar o excesso de soro sobre as lâminas.
 9. Incubação em câmara úmida com a frutalina biotilada, durante 18 horas a 8°C.
 10. Lavagem com TBS 3x/5min.
 11. Incubação em câmara úmida com strep ABC-HRP 1:200 (Catálogo N^o PK6100, Vector Corp. Burlingame, Califórnia, EUA) em TRIS-Hcl durante 15 min. As soluções já vêm prontas para o uso.
 12. Lavagem com TBS 3x / 5min.
 13. Revelação com 3,4 diaminobenzidina (DAB) (Catálogo N^o D5637, Sigma Missouri, EUA), uma pastilha para cada 10ml de solução final, durante 10min. Adicionar 1 microl de H₂O₂ (Catálogo N^o H1009, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri: EUA) P.A. para cada 1ml de DAB no momento do uso.
 14. Lavagem em água corrente por 5min.
 15. Contraste com hematoxilina por 30s (controlar intensidade).
 16. Desidratação:
 - ✓ etanol 50% - 1min;

- ✓ etanol 80% - 1min;
- ✓ etanol 95% - 1min;
- ✓ etanol 100% - 1 min,3 x;
- ✓ xilol 100% - 1min, 3x.

17. Montagem das lâminas em bálsamo.

18. Análise ao microscópio óptico comum.

Foi utilizado como controle positivo, cortes histológicos de um caso com diagnóstico morfológico de carcinoma papilífero de tireóide e controle negativo, os casos do estudo com a exclusão da sonda.

4.6 Protocolo para Análise e Padronização da Leitura do Resultado do Estudo Histoquímico

Uma vez terminadas as reações histoquímicas utilizando a frutalina biotilizada como sonda, as lâminas foram analisadas individualmente e os dados registrados em planilha (Apêndice III e IV). Durante a análise observou-se nas células RS e suas variantes:

1. Se houve marcação: + ou –
2. Intensidade da marcação: + (fraca) ou ++ (moderada) e +++ (forte)
3. Tipo de marcação: citoplasmática (Fbc), membranar (Fbm) ou paranuclear (golgiana – Fbg)

Os casos foram considerados positivos para Fb quando pelo menos 1 célula visualizada no corte era obviamente positiva. A positividade era representada pela coloração marrom.

Algumas observações subjetivas e descritivas foram realizadas nos cortes analisados em relação à marcação pela Fb nas células acessórias e no microambiente do linfonodo.

4.7 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pelo próprio pesquisador, supervisionado pelo orientador e profissional de estatística, usando o software de domínio público Epi-Info2000. Para análise bivariada, foram utilizados os testes qui-quadrado de associação com a correção de Yates. Quando os dados não alcançavam os critérios necessários para o uso do qui-quadrado, utilizou-se o teste exato de Fisher, adotando-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados são apresentados sob a forma de valores médios e distribuição de frequências conforme o tipo de variável. Para melhor visualização dos resultados, foram utilizados gráficos e tabelas.

4.8 Aspectos Éticos

Projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do ICC-HC (Anexo 1).

A obtenção destes materiais biológicos foi de arquivo e sua utilização não ocasionou alteração na rotina de exame ou procedimento envolvido. As amostras foram mantidas anônimas, salvo que as novas informações geradas podiam beneficiar diretamente ao próprio paciente.

Devido à impossibilidade de obtenção do Consentimento Informado de todos os pacientes dos quais foram consultados os prontuários para coleta de dados, foi utilizado um Termo de Compromisso de Utilização de Dados (Apêndice V), preenchido por todos os pesquisadores e colaboradores envolvidos na manipulação de dados. Todas as pessoas, pesquisadores ou colaboradores, terão compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato dos pacientes quando da divulgação dos resultados. Os dados obtidos somente poderão ser utilizados para o projeto ao qual se vinculam. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa, que deverá ser submetido à apreciação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas, morfológicas e de imunohistoquímica da amostra

Foram avaliados 54 casos com diagnóstico histopatológico de LHc que preencheram os critérios de inclusão no estudo. A idade ao diagnóstico variou de 3 a 76 anos com a média de 25,9 anos e a mediana de 23,5 anos. Os pacientes foram estratificados de acordo com a faixa etária em: ≤ 18 anos, >18 anos e ≤ 45 anos e > 45 anos (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição, segundo a faixa etária, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

Análise estatística	Faixa etária		
	≤ 18 anos	>18 anos e ≤ 45 anos	>45 anos
Total (n=54)	18 (33,3%)	30 (55,6%)	6 (11,1%)
Média	12,83	26,6	61,8
Variância	20,85	30,52	11,089
Moda	11	24	50
Mediana	14,5	29	73
Valor mínimo	3	20	50
Valor máximo	18	40	76

Em relação ao sexo, 30 eram do sexo masculino (55,6%) e 24 do sexo feminino (44,4%) (Figura 3). Não existia diferença estatisticamente significativa em

relação ao sexo na população estudada ($p=0,42$) e a proporção F:M foi de 1:1,25. Na faixa etária de menores de 18 anos, 12 eram do sexo masculino (66,6%) e 6 (33,4%) eram do sexo feminino e a proporção F:M foi de 1:2.

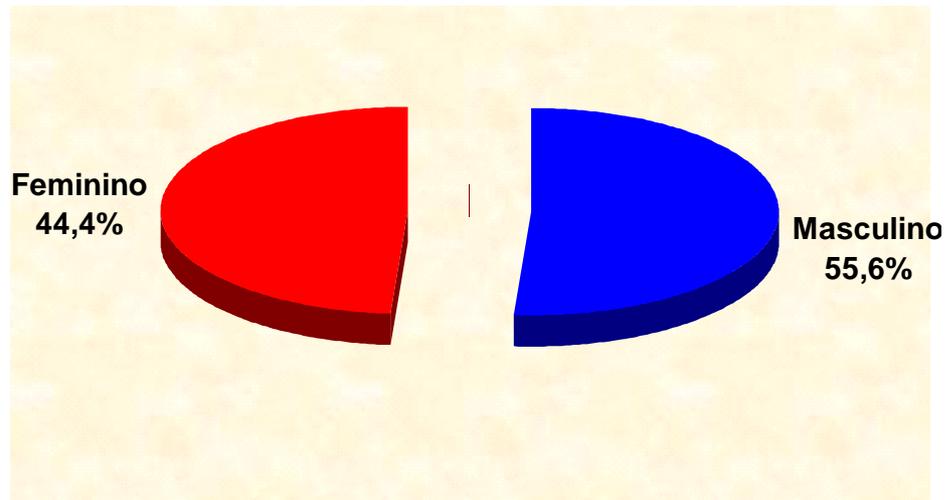


Figura 3 - Distribuição, segundo o sexo, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

As principais características clínicas, morfológicas e de resposta inicial ao tratamento dos pacientes estão resumidas na tabela 5.

Tabela 5 - Frequência das características morfológicas, clínicas, de estadiamento e de resposta ao ABVD, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará (n = 54).

CARACTERÍSTICAS	NÚMERO DE PACIENTES	
	N	%
Diagnóstico		
LHEN	31	57,4
LHCM	18	33,3
LHIN	3	5,6
LHRL	2	3,7
Linfonodos		
Cervical	39	72,2
Supraclavicular	35	64,8
Mediastinal	33	61,1
Axilar	17	31,5
Abdominal	10	18,5
Inguinal	6	11,1
Estádio (Ann Arbor)		
I	6	11,1
II	29	53,7
III	12	22,2
IV	7	13
Sintomas B		
Sim	33	61,1
Não	21	38,9
Doença Bulky		
Sim	18	33,3
Não	36	66,7
Infiltração extralinfonodal		
Sim	11	20,4
Não	43	79,6
Recidiva		
Sim	7	13,5
Não	45	86,5
Resposta ao tratamento		
Favorável	33	61,1
Desfavorável	18	33,3
Não avaliada	3	5,6

Os pacientes foram agrupados de acordo com o sexo e os subtipos histológicos. Existe uma predominância (77,7%) do sexo masculino no subtipo LHCM (14/18) (R=1:3,5), e uma predominância (61,2%) do sexo feminino no LHEN (19/31) (p=0,019).

Na faixa etária de menores de 18 anos, não houve predomínio de subtipos (44,4% de LHEN e 44,4% de LHCM).

Os resultados estão na tabela 6.

Tabela 6 - Frequência do subtipo histológico do LHc, segundo o sexo, em uma amostra de LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Nº DE CASOS	Sexo		
		Masc.	Fem.	Total
LHEN	31	12 (38,7%)	19 (61,2%)	31 (57,4%)
LHCM	18	14 (77,7%)	4 (22,3%)	18 (33,3%)
LHIN	3	3 (100%)	0	3 (5,6%)
LHRL	2	1 (50%)	1 (50%)	2 (3,7%)
TOTAL	54	30 (55,6%)	24 (44,4%)	54

Valor do p LHCM e LHEN: 0,019^{x2}

^{x2} = Teste do qui quadrado
Masc. Masculino
Fem. Feminino

Os pacientes foram agrupados de acordo com a extensão da doença em doença localizada (estádios IA, IB e IIA) e doença avançada (estádios IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB). De acordo com esta classificação, 64,8% (35/54) dos pacientes do estudo apresentavam doença avançada ao diagnóstico (Figura 4).

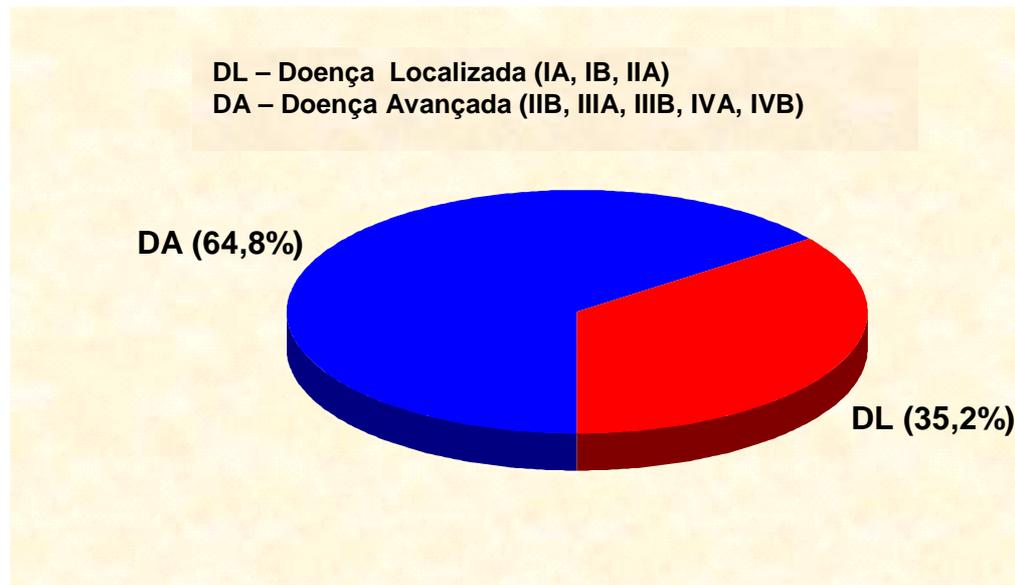


Figura 4 - Distribuição segundo a extensão da doença, em uma amostra de pacientes com LHC ,1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

Em relação ao fenótipo das células RS, a positividade global para CD15 foi de 85,2% (46/54), 98,1% para o CD30 (53/54) e 7,4% para o CD20 (4/54). A tabela 7 mostra a frequência do fenótipo de acordo com o subtipo histológico.

Tabela 7 - Frequência do fenótipo das células RS e variantes, segundo o tipo histológico em uma amostra de LHC, 1999-2005,ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Nº DE CASOS	FENÓTIPO		
		CD15+	CD20+	CD30+
LHEN	31	25 (80,6%)	3 (9,7%)	30 (96,7%)
LHCM	18	16 (88,9%)	0	18 (100%)
LHIN	3	3 (100%)	1 (33,3%)	3 (100%)
LHRL	2	2 (100%)	0	2 (100%)
TOTAL	54	46 (85,2%)	4 (7,4%)	53 (98,1%)

O fenótipo mais freqüente na amostra foi CD15+CD20-CD30+ (41/54) (75,9%). A prevalência das combinações dos fenótipos está descrita na tabela 8.

Tabela 8 - Prevalência da combinação dos fenótipos das células RS e variantes em uma amostra de pacientes com LHc, ICC/HC, 1999-2005, Fortaleza, Ceará.

FENÓTIPO	PREVALÊNCIA	
	N	%
CD15+ CD20- CD30+	41	75,9
CD15- CD20- CD30+	8	14,8
Outros	5	10,3

5.2 Marcação global pela Fb, das células RS e variantes, em uma amostra de LHc

A positividade global pela Fb nas células RS nos LHc foi de 85,2% (46/54).

Não houve diferença com significância estatística quando comparado à marcação pela Fb com fatores clínicos indicativos de prognóstico como mostra os resultados da tabela 9.

Tabela 9 - Frequência de marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo as características clínicas e de estadiamento, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, Fortaleza, Ceará.

CARACTERÍSTICAS	Nº DE PACIENTES	MARCAÇÃO PELA Fb		VALOR p
		Fb+	Fb-	
Sexo				
Feminino	24	22 (91,7%)	2 (8,3%)	0,210 ^v
Masculino	30	24 (80%)	6 (20%)	
Idade				
<=18 anos	18	16 (88,9%)	2 (11,1%)	0,861 ^{x2}
<18 e >=45 anos	30	25 (83,3%)	5 (16,7%)	
> 45 anos	6	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
Estádio (Ann Arbor)				
I	6	5 (83,3%)	1 (16,7%)	I+II com III+IV 0,580 ^{x2}
II	29	25 (86,2%)	4 (13,8%)	
III	12	10 (83,3%)	2 (16,7%)	
IV	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)	
Sintomas B				
Sim	33	28 (84,8%)	5 (15,2%)	0,459 ^v
Não	21	18 (85,7%)	3 (14,3%)	
Linfonodos				
Menos de 3 sítios	42	36	6	

^{x2} = Teste do qui quadrado

^v = Teste exato de Fisher

Tabela 9 (continuação) - Frequência de marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo as características clínicas e de estadiamento, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, Fortaleza, Ceará.

CARACTERÍSTICAS	Nº DE PACIENTES	MARCAÇÃO PELA Fb		VALOR p
		Fb+	Fb-	
		(85,7%)	(14,3%)	
4 ou mais sítios	12	10 (83,3)	2 (16,7%)	0,581 ^v
Doença Bulky				
Sim	18	14 (77,8%)	4 (22,2%)	0,243 ^v
Não	36	32 (88,9%)	4 (11,1%)	
Infiltração extralinfonodal				
Sim	11	9 (81,8%)	2 (18,2%)	0,519 ^v
Não	43	37 (86%)	6 (14%)	
Recidiva				
Sim	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0,701 ^v
Não	45	38 (84,4%)	7 (15,6%)	

^{x2} = Teste do qui quadrado

^v = Teste exato de Fisher

A extensão da doença ao diagnóstico e a resposta ao tratamento ao inicial também foram avaliados de acordo com a marcação pela Fb nas células RS nos pacientes com LHc. Não houve diferença significativa entre estes critérios (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Frequência da marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo a extensão da doença, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

EXTENSÃO DA DOENÇA	MARCAÇÃO PELA Fb		TOTAL
	Fb+	Fb-	
Doença avançada	30 (85,7%)	5 (14,3%)	35 (64,8%)
Doença localizada	16 (84,2%)	3 (15,8%)	19 (35,2%)
TOTAL	46 (85,2%)	8 (14,8%)	54

χ^2 = Teste do qui quadrado

$p=0,587^{\chi^2}$

DL: Doença Localizada (IA, IB, IIA)

DA: Doença Avançada (IIB, IIIA, IIIB, IVA, IVB)

Tabela 11 - Frequência da marcação das células RS e variantes pela Fb, segundo a resposta inicial ao ABVD, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

RESPOSTA INICIAL AO ABVD	MARCAÇÃO PELA FRUTALINA		TOTAL
	Fb+	Fb-	
Favorável	27 (81,8%)	6 (18,2%)	33 (64,7%)
Desfavorável	16 (88,9%)	2 (11,1%)	18 (35,3%)
TOTAL	43 (84,3%)	8 (15,7%)	51

χ^2 = Teste do qui quadrado

$p=0,400^{\chi^2}$

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a marcação pela Fb e os quatro subtipos histológicos estudados do LHc. Os resultados estão representados na tabela (Tabela 12).

Tabela 12 - Frequência da marcação das células RS e variantes pela fb, segundo o subtipo histológico, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	MARCAÇÃO PELA Fb		TOTAL
	Fb+	Fb-	
LHEN	26 (83,9%)	5 (16,1%)	31 (57,4%)
LHCM	15 (83,3%)	3 (16,7%)	18 (33,3%)
LHIN	3 (100%)	0 (0%)	3 (5,6%)
LHRL	2 (100%)	0 (0%)	2 (3,7%)
TOTAL	46 (85,2%)	8 (14,8%)	54

^{x2} = Teste do qui quadrado

p=0,810^{x2}

Quando comparada à marcação pela Fb com a expressão fenotípica das células RS nos LHc, foi observada uma frequência de positividade global a Fb igual à positividade global das células RH e suas variantes pelo CD15 (85,2%) (Tabela 13).

Tabela 13 - Comparação entre a frequência de positividade a Fb e o fenótipo das células RS e variantes, segundo o tipo subtipo histológico, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Nº DE CASOS	Fb+	FENÓTIPO		
			CD15+	CD20+	CD30+
LHEN	31	26 (85,2%)	25 (80,6%)	3 (9,6%)	30 (96,7%)
LHCM	18	15 (83,3%)	16 (88,9%)	0	18 (100%)
LHIN	3	3 (100%)	3 (100%)	1 (33,3%)	3 (100%)
LHRL	2	2 (100%)	2 (100%)	0	2 (100%)
TOTAL	54	46 (85,2%)	46 (85,2%)	4 (7,4%)	53 (98,1%)

Foi comparada isoladamente a marcação da frutalina com a expressão de CD15 e CD20. Os resultados não apresentaram significância estatística, apesar de se observar uma tendência maior frequência de positividade nos pacientes CD15+ (85,2%) do que nos CD15-(75%). Os resultados estão representados nas tabela 14 e 15.

Tabela 14 - Frequência da marcação das células RS e variantes pela Fb, em relação à expressão de CD15, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

FENÓTIPO	MARCAÇÃO PELA Fb		TOTAL
	Fb+	Fb-	
CD15+	40 (85,2%)	6 (14%)	46 (85,2%)
CD15-	6 (75%)	2 (25%)	8 (14,2%)
TOTAL	46 (85,2%)	8 (14,2%)	54

^v = Teste exato de Fisher

p=0,333^v

Tabela 15 - Frequência da marcação das células RS e variantes pela Fb, em relação à expressão de CD20, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

FENÓTIPO	MARCAÇÃO PELA Fb		TOTAL
	Fb+	Fb-	
CD20+	4 (100%)	0	4 (7,4%)
CD20-	42 (84%)	8 (16%)	50 (92,6%)
TOTAL	46 (85,2%)	8 (14,8%)	54

^v = Teste exato de Fisher

p=0,515^v

5.3 Marcação pela Fb em relação aos padrões: membranar, citoplasmática e puntiforme paranuclear (golgiana)

Foram detectados três padrões de positividade na marcação pela Fb: membranar (Fbm), citoplasmático (Fbc) e golgiana (Fbg). Analisando cada padrão de marcação isoladamente foi observado que o padrão de marcação Fbg é o mais freqüente sendo detectado em 91,3% dos casos positivos (42/46), seguido pelo padrão Fbc detectado em 54,3% dos casos positivos (25/46) e pelo padrão de marcação Fbm detectado em apenas 15,2% dos casos positivos (7/46). Comparando a proporção de marcação mais freqüente, isto é, Fbg com as marcações Fbm e Fbc, existe uma diferença estatisticamente significativa entre eles ($p=0,008$) (Gráfico 1).

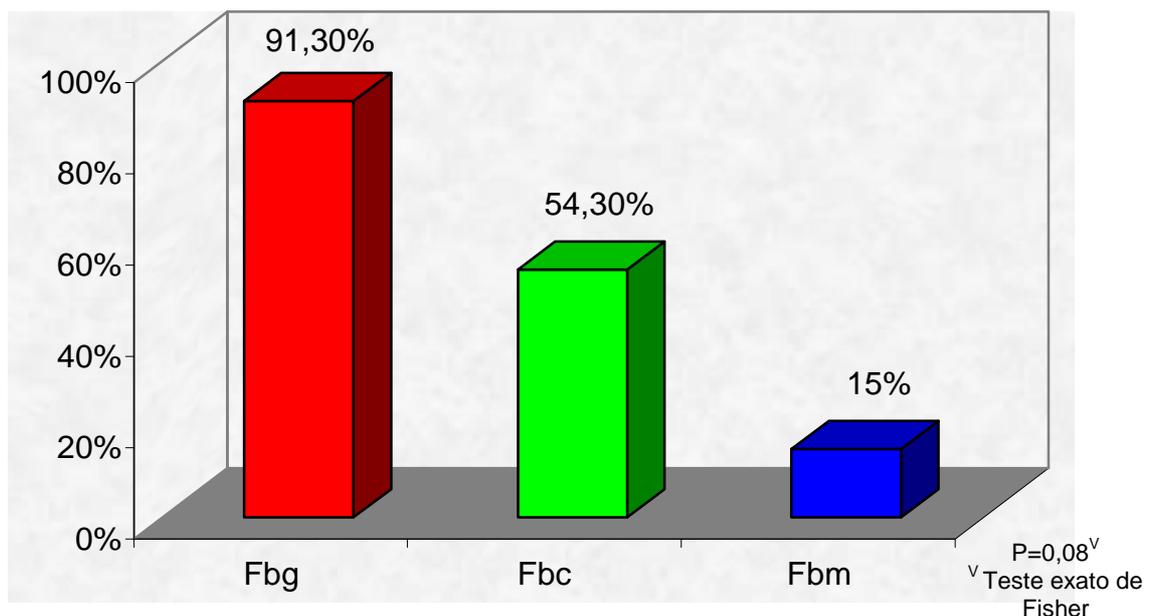


Gráfico 1 - Comparação das porcentagens do tipo de marcação: Fbg, Fbc, Fbm, pela Fb nas células RS e variantes, em uma amostra de pacientes com LHC, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

Várias combinações de padrões de positividade foram observadas. O padrão de marcação Fbg isolado foi o mais comum (47,8%), e junto com os casos

que tiveram marcação Fbg concomitante com Fbc (34,8%), representa 82,6% dos casos positivos. Todas as combinações estão representadas na tabela 16.

Tabela 16 - Frequência das combinações dos padrões de positividade pela Fb nas células RS e variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

PADRÃO DE MARCAÇÃO	Nº DE CASOS POSITIVOS
Fbg	22 (47,8%)
Fbm	0
Fbc	1 (2,2%)
Fbg + Fbc	16 (34,8%)
Fbg + Fbm	0
Fbm + Fbc	3 (6,5%)
Fbg + Fbc + Fbm	4 (8,7%)
TOTAL	46

A positividade das células RS a Fb também foi classificada, de forma subjetiva, em relação à intensidade: forte (+++), moderada (++) e fraca (+). Para melhor análise estatística, consideramos as marcações de ++ e +++ como forte e + como fraca. Houve um predomínio de positividade de fraca intensidade nos três padrões de marcação. Os resultados estão listados na tabela 17.

Tabela 17 - Frequência da positividade pela Fb nas células RS e variantes, segundo a intensidade de marcação, em uma amostra de LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

INTENSIDADE DA MARCAÇÃO	Fbg	Fbc	Fbm
Fraca	23	16	5
(+)	(54,8%)	(64%)	(71,4%)
Forte	19	9	2
(++/+++)	(45,2%)	(36%)	(28,6%)
TOTAL	42	25	7
	(100%)	(100%)	(100%)

Comparando a associação dos três padrões de marcação com o subtipo histológico do LHc, observamos que 77,4% (24/31) dos pacientes com diagnóstico de LHEN e 72,2% (13/18) dos pacientes com diagnóstico de LHCM apresentaram marcação do tipo Fbg; 54,8% (17/31) dos pacientes com diagnóstico de LHEN e 33,3% (6/18) dos pacientes com diagnóstico de LHCM apresentaram marcação do tipo Fbc; e 16,1% (5/31) dos pacientes com diagnóstico de LHEN e 5,5% (1/18) dos pacientes com diagnóstico de LHCM apresentaram marcação do tipo Fbm. Os resultados estão representados no gráfico 2.

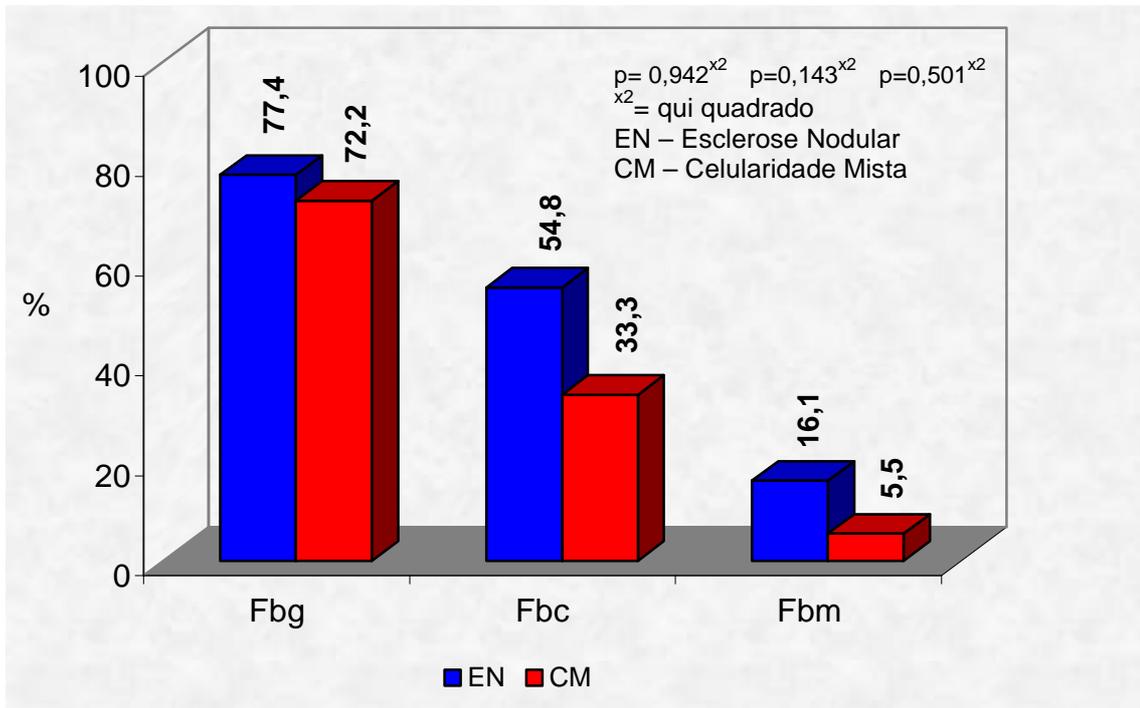


Gráfico 2 - Comparação da frequência de positividade das células RS e variantes pela Fb nos padrões: Fbg, Fbc, Fbm, segundo os subtipos histológicos LHCM e LHEN, em uma amostra de pacientes com LHc, 1999-2005, ICC/HC, Fortaleza, Ceará.

A frequência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável sexo. Os resultados estão descritos na tabela 18.

Tabela 18 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com o subtipo histológico e o sexo, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	SEXO		SEXO		SEXO	
	MASC	FEM	MASC	FEM	MASC	FEM
LHCM	11 (55%)	2 (11,8%)	4 (44,4%)	2 (14,3%)	0	1 (20%)
LHEN	9 (45%)	15 (88,2%)	5 (55,6%)	12 (85,7%)	1 (100%)	4 (80%)
TOTAL	20 (54%)	17 (46%)	9 (39,1%)	14 (60,9%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)

^{x2}qui quadrado

p=0,016 ^{x2}

p=0,131^v

p=0,833^v

^v teste exato de Fisher

Masc. Masculino

Fem. Feminino

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável idade, estratificada segundo critérios prognósticos em: ≤ 45 anos e > 45 anos. Os resultados estão descritos na tabela 19.

Tabela 19 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com o subtipo histológico e a faixa etária, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	IDADE		IDADE		IDADE	
	≤ 45 ANOS	> 45 ANOS	≤ 45 ANOS	> 45 ANOS	≤ 45 ANOS	> 45 ANOS
LHCM	12 (35,3%)	1 (33,3%)	6 (27,3%)	0	1 (16,7%)	0
LHEN	22 (64,7%)	2 (66,7%)	16 (72,7%)	1 (100%)	5 (83,3%)	0
TOTAL	34 (91,9%)	3 (8,1%)	22 (95,7%)	1 (4,3%)	6 (100%)	0

^{x2}qui quadrado

p=0,722^v

p=0,739^v

P=1,000^{x2}

^v teste exato de Fisher

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável presença de recidiva. Os resultados estão descritos na tabela 20.

Tabela 20 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a presença de recidiva, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	RECIDIVA		RECIDIVA		RECIDIVA	
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
LHCM	2 (40%)	11 (36,7%)	1 (50%)	5 (26,3%)	1 (50%)	0
LHEN	3 (60%)	19 (63,3%)	1 (50%)	14 (73,7%)	1 (50%)	4 (100%)
TOTAL	5 (14,3%)	30 (85,7%)	2 (9,5%)	19 (90,5%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)

^{x2}qui quadrado

p=0,62 5^v

p=0,500^v

p=0,333^v

^v teste exato de Fisher

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo avariável número de linfonodos, estratificados segundo os critérios de prognóstico em ≤ 3 sítios de linfonodos e > 3 sítios de linfonodos. Os resultados estão descritos na tabela 21.

Tabela 21 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e o número de linfonodos, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	Nº DE LINFONODOS		Nº DE LINFONODOS		Nº DE LINFONODOS	
	≤ 3	> 3	≤ 3	> 3	≤ 3	> 3
LHCM	10 (35,7%)	3 (37,5%)	4 (21,1%)	2 (66,7%)	0	1 (100%)
LHEN	18 (64,3%)	5 (62,5%)	15 (78,9%)	1 (33,3%)	5 (100%)	0
TOTAL	28 (77,8%)	8 (22,2%)	19 (86,4%)	3 (13,6%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)

^{x2}qui quadrado

p=0,618^v

p=0,168^v

p=0,166^v

^v teste exato de
Fisher

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável presença de sintomas B. Os resultados estão descritos na tabela 22.

Tabela 22 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a presença de sintoma B, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg		Fbc		Fbm	
	SINTOMAS B		SINTOMAS B		SINTOMAS B	
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
LHCM	10 (43,5%)	3 (21,4%)	5 (38,5%)	1 (10%)	1 (25%)	0
LHEN	13 (56,5%)	11 (78,6%)	8 (61,5%)	9 (90%)	3 (75%)	2 (100%)
TOTAL	23 (62,2%)	14 (37,8%)	13 (56,5%)	10 (43,5%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)

^{x2}qui quadrado

p=0,157^v

p=0,144^v

p=0,666^v

^v teste exato de Fisher

Sintomas B – Febre, Sudorese noturna, perda de peso

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável presença de doença Bulky mediastinal. Os resultados estão descritos na tabela 23.

Tabela 23 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a presença de doença Bulky mediastinal, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	DOENÇA BULKY		DOENÇA BULKY		DOENÇA BULKY	
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
LHCM	3 (27,3%)	10 (38,5%)	2 (25%)	4 (26,7%)	0	1 (25%)
LHEN	8 (72,7%)	16 (61,5%)	6 (75%)	11 (73,3%)	2 (100%)	3 (75%)
TOTAL	11 (29,7%)	26 (70,3%)	8 (34,7%)	15 (65,2%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)

^{x2}qui quadrado

p=0,398^v

p=0,666^v

p=0,666^v

^v teste exato de Fisher

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável infiltração extralinfonodal (baço, fígado ou medula óssea). Os resultados estão descritos na tabela 24.

Tabela 24 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a infiltração extralinfonodal (baço, medula óssea ou fígado), 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc=		Fbm+	
	INFILTRAÇÃO DE ÓRGÃO		INFILTRAÇÃO DE ÓRGÃO		INFILTRAÇÃO DE ÓRGÃO	
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO
LHCM	3 (42,9%)	10 (33,3%)	1 (25%)	5 (26,3%)	0	1 (25%)
LHEN	4 (57,1%)	20 (66,7%)	3 (75%)	14 (73,7%)	2 (100%)	3 (75%)
TOTAL	7 (18,9%)	30 (81,1%)	4 (17,4%)	19 (82,6%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)

χ^2 qui quadrado

p=0,474^v

p=0,729^v

p=0,666^v

^v teste exato de Fisher

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável extensão da doença, extratificados segundo critérios prognósticos em doença localizada (estádios IA, IIA e IIA, segundo Ann Arbor) e doença avançada (estádios IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB, segundo Ann Arbor). Os resultados estão descritos na tabela 25.

Tabela 25 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a extensão da doença, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	EXTENSÃO DA DOENÇA		EXTENSÃO DA DOENÇA		EXTENSÃO DA DOENÇA	
	DL	DA	DL	DA	DL	DA
LHCM	4 (30,8%)	9 (37,5%)	1 (12,5%)	5 (33,3%)	0	1 (16,7%)
LHEN	9 (69,2%)	15 (62,5%)	7 (87,5%)	10 (66,7%)	0	5 (83,3%)
TOTAL	13 (35,1%)	24 (64,9%)	8 (34,8%)	15 (65,2%)	0	6 (100%)

^{x2}qui quadrado

p=0,485^v

p=0,287^v

p=1,000^{x2}

^v teste exato de Fisher

DL: Doença Localizada (IA, IB, IIA)

DA: Doença Avançada (IIB, IIIA, IIIB, IVA, IVB)

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável resposta ao tratamento, estratificada em resposta favorável (remissão completa clínica até o 4º ciclo de ABVD) e resposta desfavorável (progressão de doença ou remissão clínica parcial até o 4º ciclo de ABVD). Os resultados estão descritos na tabela 26.

Tabela 26 - Comparação da frequência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a resposta inicial ao ABVD, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	RESPOSTA AO ABVD		RESPOSTA AO ABVD		RESPOSTA AO ABVD	
	RF	RD	RF	RD	RF	RD
LHCM	10 (50%)	3 (21,4%)	3 (27,3%)	3 (30,0%)	0	1 (33,3%)
LHEN	10 (50%)	11 (78,6%)	8 (72,7%)	7 (70,0%)	3 (100%)	2 (66,7%)
TOTAL	20 (58,8%)	14 (41,1%)	11 (52,3%)	10 (47,7%)	3 (50%)	3 (50%)

^{x2}qui quadrado

p=0,183^{x2}

p=0,632^v

p=0,500^v

^v teste exato de Fisher

RF: Resposta favorável (Remissão clínica até o 4º ciclo de ABVD)

RD: Resposta desfavorável (Progressão de doença ou Resposta clínica parcial até o 4º ciclo de ABVD)

A frequência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável expressão de CD15. Os resultados estão descritos na tabela 27.

Tabela 27 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a expressão de CD15, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg+		Fbc+		Fbm+	
	EXPRESSÃO PELO CD15		EXPRESSÃO PELO CD15		EXPRESSÃO PELO CD15	
	+	-	+	-	+	-
LHCM	11 (36,7%)	2 (33,3%)	5 (27,8%)	1 (20,0%)	0	1 (33,3%)
LHEN	19 (63,3%)	4 (66,7%)	13 (72,2%)	4 (80,0%)	3 (100%)	2 (66,7%)
TOTAL	30 (83,3%)	6 (16,7%)	18 (78,2%)	5 (21,8%)	3 (50%)	3 (50%)
^{x2} qui quadrado ^v teste exato de Fisher	p=0,525 ^v		p=0,608 ^v		p=0,500 ^v	

A freqüência dos padrões de marcação Fbg, Fbc e Fbm foram avaliados individualmente de acordo com os subtipos histológicos LHCM e LHEN, segundo a variável expressão de CD20. Os resultados estão descritos na tabela 28.

Tabela 28 - Comparação da freqüência dos padrões de positividade pela Fb: Fbg, Fbc e Fbm, nas células RS e suas variantes, em uma amostra de pacientes com LHc, de acordo com os subtipos histológicos e a expressão de CD20, 1999-2005, HC/ICC, Fortaleza, Ceará.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	Fbg		Fbc		Fbm	
	EXPRESSÃO PELO CD20		EXPRESSÃO PELO CD20		EXPRESSÃO PELO CD20	
	+	-	+	-	+	-
LHCM	0	13 (37,1%)	0	6 (28,6%)	0	1 (20,0%)
LHEN	2 (100%)	22 (62,9%)	2 (100%)	15 (71,4 %)	1 (100%)	4 (80,0%)
TOTAL	2 (5,4%)	35 (94,5%)	2 (8,7%)	21 (91,3%)	1 (16,7%)	5 (83,3%)

^{x2}qui quadrado

p=0,414^v

p=0,537^v

p=0,833^v

^v teste exato de Fisher

Durante a avaliação das lâminas, algumas observações descritivas foram feitas em relação à marcação pela frutalina nas células que compõe o corte. Pequenos linfócitos e granulócitos não mostraram marcação. Existe uma positividade discreta constante nas células do endotélio. Os histiócitos, macrófagos, plasmócitos e células reticulares dendríticas marcam em sua maioria com padrão citoplasmático difuso, diferente do padrão de marcação apresentado pelas células RS. Existe pouca marcação de fundo (colágeno e rede de fibrina).

As figuras mostram exemplos dos casos com marcação pela frutalina.

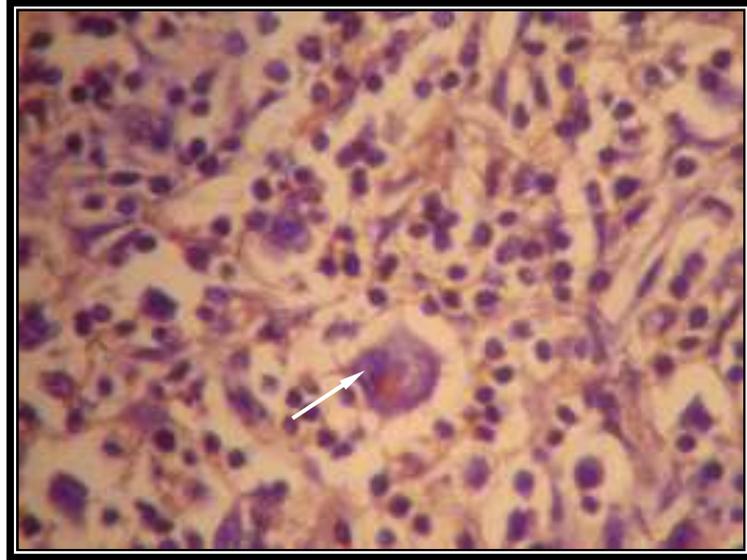


Figura 5 - Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (400x). Observa-se célula RS com marcação tipo Fbg (paranuclear puntiforme). Pequenos linfócitos negativos.

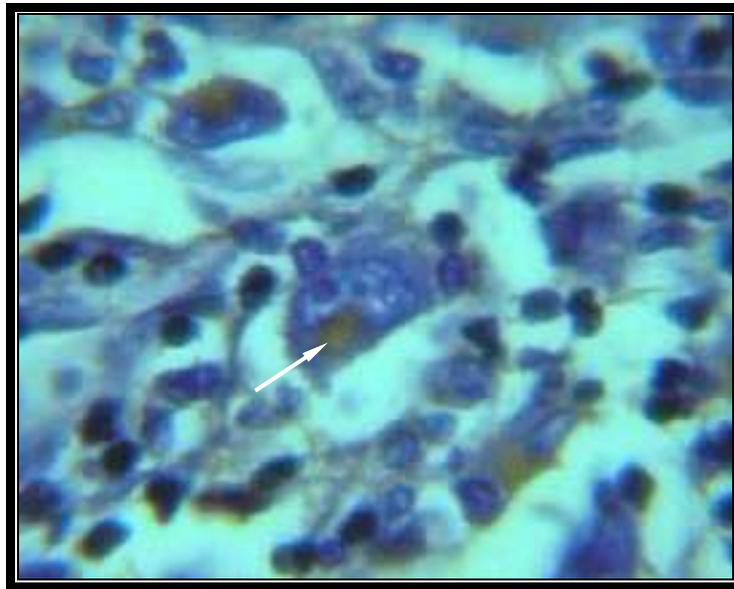


Figura 6 - Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (em imersão, 1000x). Observa-se célula RS com marcação tipo Fbg (paranuclear puntiforme).

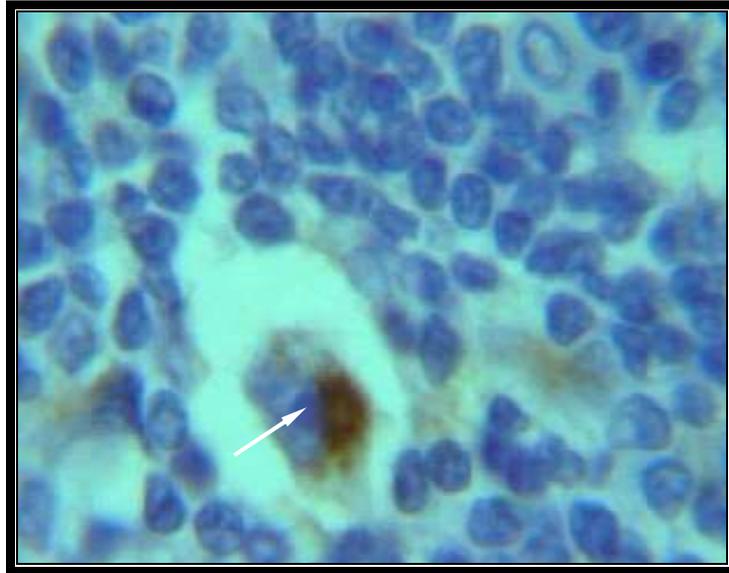


Figura 7- Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (em imersão, 1000x). Observa-se célula RS com marcação pelo CD15 (paranuclear puntiforme).

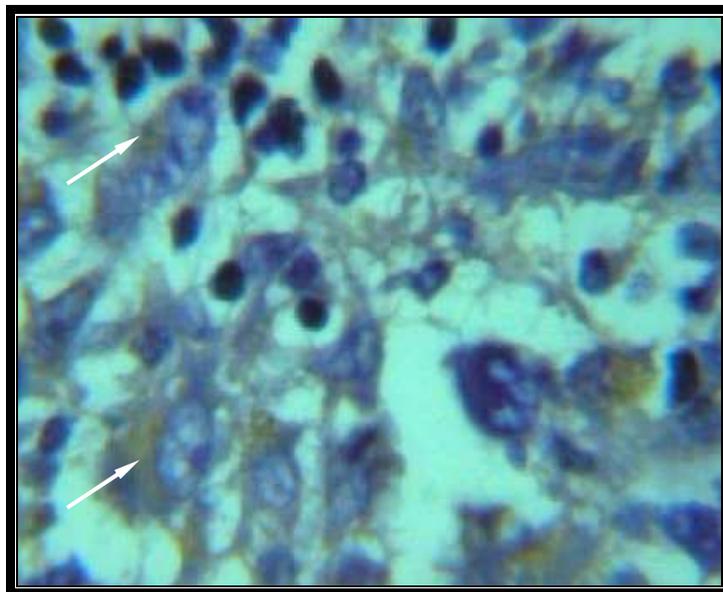


Figura 8 - Área de linfonodo com diagnóstico de LHc marcado pela Fb (em imersão, 1000x). Observa-se histiócitos com marcação citoplasmática pela Fb.

6 DISCUSSÃO

6.1 Características clínicas, morfológicas e imunofenotípicas da amostra com diagnóstico de LHc

6.1.1 Características clínicas e estadiamento

Estudos epidemiológicos sobre LH tem sugerido a existência de diferentes apresentações da doença de acordo com o nível de desenvolvimento industrial e sócio-econômico do país (CORREIA; O'CONNOR, et al., 1971). O conhecimento a respeito das características e do comportamento da doença de Hodgkin, no Brasil, não está completamente estabelecido, já que existem diferenças entre as regiões geográficas e poucos estudos multicêntricos com amostra ampliada foram publicados.

Em recente estudo realizado em quatro hospitais de São Paulo e um de Campinas, região sudeste do Brasil, Vassalo e cols. (2005) avaliaram 1025 casos e mostraram a predominância do sexo masculino (1:1,5), sendo esta diferença maior entre os subtipos LHPLN (1:2,5) e LHCM (1:2,3). Nos casos com diagnóstico de LHCM, 70% dos pacientes eram do sexo masculino. A predominância do sexo masculino neste subtipo histológico está de acordo com os dados da OMS (STEIN et al. 2001). Em relação à faixa etária, a maioria dos pacientes (31.5%) pertencia as primeiras segundas décadas de vida.

Loureiro et al. (2004) realizaram estudo com 64 pacientes provenientes do estado do Rio de Janeiro, região sudeste do Brasil e também, em sua amostra, mostrou a predominância do sexo masculino (67%) em relação ao sexo feminino (33%). A relação F:M foi de 1:2. A média de idade dos casos foi de 37 anos (variando de 11-84 anos).

Souza et al. em 1997, estudou 134 casos de LH acima de 15 anos de idade. Em sua amostra, houve predomínio da doença no sexo masculino (R=1,31); pico de incidência entre 21 e 30 anos; 2/3 dos casos abaixo dos 40 anos; e curva decrescente de incidência após os 30 anos.

Bittencourt et al. (1987) estudaram 43 casos de LH infantil na Bahia. Houve maior número de casos abaixo dos 10 anos de idade, com acentuada predominância entre sete e oito anos. Até os seis anos de idade, não se observou predomínio dos sexos, mas dos seis aos 15 anos houve predomínio do sexo masculino (M/F = 4,8/1).

Tzankov et al. (2003) na Áustria, em um estudo clinico-patológico com 119 casos mostrou discreto predomínio do sexo masculino (R=1,2) e 72% dos pacientes tinham menos de 45 anos. Resultado semelhante foi encontrado por Smolewski et al. (2000) na Polônia, em uma análise de 327 pacientes com diagnóstico de LH, mostraram predomínio do sexo masculino (R=1,47) e 74% dos pacientes tinham menos de 45 anos. Montalbán e cols. (2004) avaliaram 259 pacientes do Grupo Espanhol de Estudo de Linfoma de Hodgkin com diagnóstico de LHc. Nesta amostra houve discreto predomínio do sexo masculino (50,2% versus 49,8%).

No presente estudo, foi observada uma média de idade de 25,9 anos, compatível com as médias descritas pela literatura, porém um pouco menor que dos países desenvolvidos, que apresentam picos na terceira década (PINTO, 2003; KENNEDY, FREGMEN, MENCK, 1998; CORREIA; O'CONNOR, 1971). A maioria dos pacientes tinha entre 18 e 45 anos (55,6%) e 88,9% tinham menos de 45 anos (tabela 4), resultado também compatível com descrições da literatura, porém com maior concentração de pacientes jovens.

Em relação ao sexo, no presente estudo houve predomínio do sexo masculino (R=1,25), principalmente nas crianças (1:2) e nos casos de LHCM (1:3,5). Dos pacientes com LHCM, 77,7% eram do sexo masculino (14/18) com diferença, em relação ao sexo feminino (4/18), estatisticamente significativa ($p=0,019$) (tabela 6). Este predomínio de LH no sexo masculino, principalmente nas crianças e no subtipo LHCM, já é bem descrito na literatura (FERREIRA, et al., 1977; PITOMBEIRA et al., 1987; LOUREIRO et al., 2004; VASSALLO et al., 2005) apesar de alguns estudos realizados em Fortaleza mostrarem o contrário. PINTO (2003) em sua amostra apresentou um predomínio do sexo feminino (57,7%), com relação F: M de 1,35: 1..

Todos os pacientes da amostra do presente estudo tinham acometimento linfonodal ao diagnóstico. O sítio linfonodal mais acometido foi o cervical (72,2%), seguido pelo supraclavicular (64,8%) e mediastinal (61,1%). Os resultados são

compatíveis com os dados da literatura, que mostram que pelo menos 90% dos pacientes têm acometimento linfonodal e 60-80% envolve linfonodos cervicais, sendo que 60% também vêm acompanhados do acometimento de linfonodos do mediastino (LANZKOWSKY et al., 2000).

Outra característica importante em relação aos dados no Brasil e países em desenvolvimento, é a alta prevalência de doença avançada ao diagnóstico.

Bittencourt et al. (1987) estudou 43 casos de doença de Hodgkin infantil na Bahia. A maioria dos casos apresentou formas avançadas da doença (64%). Loureiro et al. (2004) mostrou a mesma tendência com 78% dos pacientes do seu estudo, apresentando doença avançada ao diagnóstico. Nossos resultados mostraram que, em concordância com os dados da literatura, a maioria dos nossos pacientes, também apresentou estágios avançados da doença ao diagnóstico (64,8%). Esta característica provavelmente resulta da alta incidência de diagnóstico tardio e dificuldade de acesso da população ao serviço de saúde, além de fatores geográficos e individuais ainda não definidos e que por ventura possam influenciar na gravidade da doença.

Em relação aos critérios clínicos, no presente estudo, 64,8% dos pacientes da amostra era estágio I ou II segundo Ann Arbor; 61,1% apresentavam sintomas B; 33,3% apresentavam doença Bulky, 20,4% apresentavam doença extralinfática e 61,1% apresentaram resposta favorável ao tratamento (tabela 5).

Segundo Loureiro et al. (2004), 22% dos pacientes de seu estudo eram estágio I ou II e 74% dos pacientes apresentavam sintomas B.

Tzankov et al. (2003) na Áustria, mostraram em seu estudo sobre LH, que 67,8% dos pacientes de, eram estágio I ou II de Ann Arbor e 42,8% apresentava sintomas B.

Smolewski et al. (2000) relataram que 42,2% dos pacientes avaliados eram estágios I ou II de Ann Arbor, sendo que a maioria era estágio III (42,8%), 63,9% apresentavam sintomas B, 18,6% apresentavam doença Bulky, 24,1% apresentavam acometimento de sítio extranodal e 78,6% apresentaram resposta favorável ao tratamento inicial.

Montalbán et al. (2004) relataram que 62,9% dos pacientes eram estadios I ou II, 34% apresentavam sintomas B, 25,1% apresentavam doença Bulky e 80% dos pacientes apresentaram resposta favorável ao tratamento inicial.

A amostra do presente estudo, apesar de pequena e proveniente de uma única instituição, apresentou semelhanças em relação à média dos resultados dos outros estudos publicados com um maior número de casos, nas variáveis: estadiamento segundo Ann Arbor (I e II, 64,8% versus 22% a 67,8%), presença sintomas B (61,1% versus 34% a 74%) e presença de doença extralinfática (20,4% versus 24%). Porém mostrou um maior número de pacientes com presença de doença Bulky (33,3% versus 18% a 25,1%) e uma menor porcentagem de resposta favorável ao tratamento (61,1% versus 78,6% a 80%). O tempo médio entre o início dos sintomas e o diagnóstico pode ter influenciado no maior número de pacientes com doença Bulky, já que normalmente os nossos pacientes têm dificuldade de acesso a hospitais terciários, porém este dado não foi analisado neste estudo. A resposta ao tratamento pode ter sido influenciada pela presença de pacientes recidivados na amostra, o que certamente reduz a porcentagem de resposta favorável ao tratamento inicial.

6.1.1 Características morfológicas

Diversos estudos confirmam que o LHCM é o subtipo histológico mais freqüente nos países em desenvolvimento (LEVY, 1988; HUMMEL et al. , 1992; CHANG et al., 1993). Ferreira et al., 1977, encontraram predominância do subtipo LHCM em casos de Fortaleza – Brasil em todas as faixas etárias, porém com maior freqüência no adulto. Posteriormente Pitombeira et al., 1987 e Abreu et al., 1997; descreveram o LHCM como o subtipo mais freqüente no Brasil, baseados em estudos realizados no Ceará . Oliveira et al. (2002) realizou um estudo com 96 casos com amostras provenientes do Ceará (50) e de São Paulo (46) e observou um predomínio do subtipo LHCM em crianças e adolescentes dos dois estados e adultos de São Paulo.

Nas últimas publicações de instituições brasileiras relatando dados epidemiológicos do LH, já se observa o início de uma mudança na freqüência de incidência dos subtipos histológicos. O subtipo histológico mais freqüente

encontrado atualmente nos estudos no Brasil é o LHEN, à semelhança do que se observa nos EUA e Alemanha, seguido pelo LHCM (SOUZA et al., 1997; LOUREIRO et al., 2004; VASSALLO et al., 2005). A mudança de incidência nos subtipos histológicos tem sido observada também nos estados do nordeste, considerada como a região do Brasil com menor desenvolvimento sócio econômico. (BITTENCOURT et al., 1987; PINTO, 2003).

Os três estudos mais recentes realizados, com amostra brasileira: Pinto (2003), Loureiro et al. (2004), Vassallo et al.(2005) mostram claramente esta mudança com o predomínio do subtipo LHEN.

Pinto (2003) estudou uma amostra de 66 pacientes na cidade de Fortaleza-Ceará e encontrou uma prevalência de 57,5% de casos de LHEN e 37,8% de LHCM.

Loureiro et al. (2004) estudou uma amostra de 64 doentes com diagnóstico de LH na cidade do Rio de Janeiro. Em sua amostra, 55% dos casos tinham diagnóstico de LHEN, 25% de LHCM e 11% de LHDL.

Vassallo et al. (2005) realizou uma análise retrospectiva de 1025 casos com diagnóstico de LH no estado de São Paulo. A classificação histológica foi: LHEN em 69% dos casos; LHCM em 21,1%; LHPLN em 4,8% e LHDL em 4,6%.

Esta tendência também foi observada no presente estudo, com predomínio do LHEN (57,4%), seguido do LHCM (33,3%). Mesmo na faixa etária de menores de 18 anos, não houve predomínio do subtipo LHCM (44,4% de LHEN e 44,4% de LHEN). Historicamente, doentes dos países desenvolvidos apresentam diferenças significativas em relação aos doentes dos países em desenvolvimento. Pode-se supor que este resultado representa uma mudança das características da doença na nossa região, devido a aquisição de melhor condição econômica e social da população. Esta hipótese precisa ser confirmada com um número maior de pacientes em estudos multiinstitucionais regionais.

Não foram incluídos no estudo casos com diagnóstico de LHDL porque, devido à raridade deste subtipo, só havia três casos neste período na instituição e nenhum preencheu os critérios de inclusão.

6.1.1 Características imunofenotípicas

Todos os casos da amostra foram submetidos à rotina de diagnóstico de LH realizando imunohistoquímica com o uso dos marcadores linfóide padrões descritos pela literatura (SAID, 1992). Como os anticorpos utilizados são inespecíficos para as células RS e suas variantes, e mostram positividade muito variável, torna-se necessário o estudo em conjunto na forma de painel.

Em relação ao fenótipo das células RS, a positividade global para CD15 no presente estudo foi de 85,2% (46/54), 98,1% para o CD 30 (53/54) e 7,4% para o CD20 (4/54) (tabela 7).

O anticorpo monoclonal anti CD15, um dos anticorpos utilizados no painel para diagnóstico de LH, mostrou expressão deste antígeno em 85,2% dos casos no presente estudo. Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados em estudos anteriores realizados no Ceará por Oliveira et al. em 2002 (86%), e Pinto em 2003 (87,8%). Dados da literatura mostram uma variabilidade consistente na expressão do CD15 (56,3% a 100%) (VON WASIELEWSKI et al, 1997; ARBER; WEISS, 1993), mas em média são semelhantes ao resultado do presente estudo.

A expressão pelo CD30 é de extrema importância para o diagnóstico de LHc e está presente em quase todos os casos de LHc. O presente estudo mostrou uma positividade de 98,1% ao CD30. Dados da literatura mostram que a expressão de CD30 pelas células RS é positiva em mais de 90% dos LHc (CHANG; ARBER, WEISS, 1993; PAES; CABEÇADAS, 1999). A negatividade para o CD30, em casos de LHc onde se identifica células RS e suas variantes em fundo celular apropriado e história clínica compatíveis, deve ser justificado por perda da antigenicidade do material pesquisado ou erro de técnica como: má fixação em formalina, fragmentação do material, alteração da temperatura da parafina ou passagens muito rápidas pela bateria formol-alcool-xilol. No caso de CD30-, sugere-se, para confirmação diagnóstica, a realização de outros marcadores, como a fascina.

Quatro casos (7,4%) no presente estudo foram positivos para CD20, sendo este resultado um pouco superior ao de outros autores como, Von Wasielewski et al. (1997) que relataram positividade de 4,9% e Pinto (2003) com relato de 4,5% de positividade em sua amostra do Brasil. A variação da positividade

das células RS e suas variantes ao CD20 é muito grande, podendo em alguns casos chegar até 25% (CHU et al., 2000). Tzankov et al. (2003) observaram 20% de positividade pelo CD 20 em sua amostra. Incluindo outros marcadores para célula B, esta positividade pode chegar até 87% de acordo com alguns estudos (SCHIMD et al. , 1991; WATANABE et al., 2000)

Apesar de não haver anticorpo monoclonal específico para células RS, as formas clássicas do LH têm imunofenótipo característico: CD15+, CD30+, CD20-, CD45- (HARRIS et al, 1994, PAES ; CABEÇADAS, 1999). Von Wasielewski et al. (1997) realizaram um estudo retrospectivo sobre o impacto clínico do imunofenótipo no LH em 1286 pacientes do Grupo de Estudo Alemão do Linfoma de Hodgkin (GHSG). O estudo mostrou que 83% dos casos estudados apresentavam este imunofenótipo característico, seguido pela combinação CD15-, CD20-, CD30+ em 12% dos casos e outras combinações (CD15+, CD20+, CD30+ ou CD15-, CD20+, CD30+ ou CD15-, CD20+, CD30-), em 4,8% dos casos.

O resultado do presente estudo apresentou semelhança com os dados da literatura, principalmente em relação ao fenótipo mais comum. O fenótipo mais freqüente na amostra foi CD15+CD20-CD30+ (75,9%), seguido por CD15-, CD20-, CD30+, em 14,8% dos casos e outros (CD15+, CD20+, CD30+ ou CD15-, CD20+, CD30+ ou CD15-, CD20+, CD30-), em 10,3% dos casos.

6.2 Marcação global pela Fb nas células RS em uma amostra de LHc

Acumulam-se evidências de que os carboidratos são marcadores primários para o reconhecimento celular. Os resíduos de carboidratos dos glicoconjugados desempenham muitas funções celulares diferentes, tais como, reconhecimento, inibição por contato, crescimento e diferenciação celular. Essas funções são dependentes do número e tipo de resíduos de açúcares, de ligações anoméricas, presença ou ausência de ramificações moleculares, tipo e quantidade de ácido siálico (SHARON, 1998).

Os carboidratos de superfície são modificados durante a diferenciação celular, transformação maligna e metástase (MUSTAC et al., 1996; SHCUMARCHER et al., 1996) e isto confere heterogeneidade estrutural celular e

modificações no reconhecimento de sinais celulares alterando a função da célula. Aberrante glicosilação é um aspecto comum de malignidade, resultando na aparição de antígenos associados a tumor, que podem influenciar no crescimento tumoral, disseminação, metástase e prognóstico (MARTINEZ et al, 2002). Os carboidratos normalmente resistem bem as técnicas de histoquímica mantendo sua estrutura intacta. O emprego das lectinas na histoquímica como marcador tumoral tem então permitido evidenciar alterações de glicoconjugados celulares e entender melhor o câncer e as metástases (URDIALES-VIEDMA et al., 1985).

Lectinas pertencentes ao gênero *Artocarpus* têm sido usadas para marcação de alguns tecidos tumorais por apresentarem a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno T (ITO, 1995). A frutalina é uma lectina ainda pouco estudada. Apresenta homologia de seqüência superior a 90% com a jacalina, lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus integrifolia*, apresentando, porém, diferentes pontos de glicosilação. Possui, ainda, certa afinidade por D- manose, levando à criação de uma nova classe de lectinas, as multilectinas (MONTEIRO-MOREIRA, 2002). A extração da frutalina é relativamente simples e necessita de poucos recursos financeiros para sua purificação. Os resultados encontrados até o momento com o uso da frutalina na histoquímica de doenças neoplásicas, são animadores. Com o desenvolvimento de técnicas para produção da frutalina em larga escala, esta lectina poderá se tornar uma importante ferramenta no diagnóstico histoquímico das neoplasias, com vantagens em relação ao custo quando comparada aos anticorpos monoclonais utilizados atualmente.

Este estudo revela que a frutalina, uma lectina com especificidade para D-galactose, reage com as células RS e suas variantes em na maioria dos casos de LHc (85,2%), em tecidos fixados com formalina e embebidos em parafina, em intensidade variável, independente do tipo histológico. Logo, devido à alta positividade de marcação das células RS e variantes, a frutalina pode ser útil, associada à análise morfológica, como ferramenta para o diagnóstico de LHc. Como não existem estudos anteriores utilizando a frutalina em LH, serão utilizados para comparação resultados de estudo que utilizaram outras lectinas ligantes do mesmo grupo de carboidratos.

A lectina vegetal mais estudada em pacientes com LH até o momento foi a PNA (peanut agglutinin). As marcações de positividade variaram de 0 a 100%, de

acordo com a técnica utilizada, concentração da lectina no experimento e o número de casos avaliados. A positividade global do LHc pela frutalina encontrada no presente estudo (85,2%), foi compatível com os resultados da maioria dos estudos utilizando lectinas em LH (tabela 3).

Hsu e Jaffe em 1984 testaram o uso da lectina PNA biotilizada em linfonodos e baço em tecidos congelados e em tecidos fixados em B5 e em alguns casos embebidos em formalina e fixados em parafina. Houve marcação nas células RS e variantes em 59% dos casos (13/22).

Ree, Marshall e Kadin em 1984, utilizaram a lectina PNA em 145 linfonodos fixados em formalina e embebidos em parafina e encontraram uma positividade de marcação das células RS e variantes em 76% dos casos. Em 1989 Ree e cols. voltaram a usar a lectina PNA em LH e 85,7% (78/9) dos casos tiveram marcação nas células RS e variantes.

Möller também em 1982 foi mais além afirmando ser a lectina PNA um importante marcador, para casos com número reduzido de células RS e variantes no corte, e que pode ser utilizada para o diagnóstico precoce, já que em seu estudo obteve uma positividade forte e em 100% dos casos.

Sarker e cols em 1992 relataram uma positividade de marcação nas células RH e suas variantes, em 97% (32/33) dos casos, utilizando a lectina BPA (*Bauhinia purpúrea*). No mesmo estudo foi utilizada também a lectina PNA com positividade de marcação de 69,7% (23/32).

Strauchen em 1984 utilizou a lectina Con A, PNA e ASP em material de biopsia de LH. A Con A mostrou seletiva marcação citoplasmática nas células RS nos 13 casos de LHc analisados. Neste estudo não houve marcação nas células RS e variantes pelas lectinas PNA e ASP.

Existem dois relatos na literatura de marcação muito fraca ou ausente nas células RS e variantes com o uso da lectina PNA (STRAUCHEN, 1984; ERBER et al., 1992). Strauchen obteve este resultado provavelmente devido à técnica, já que o tempo de incubação com a lectina PNA, foi de apenas 30 min. Erber e cols. utilizaram para o estudo aspirado de medula óssea, e acredita-se, que o processo de descalcificação interfira no resultado.

No presente estudo, três padrões de positividade foram detectados na análise dos casos de LH após a histoquímica com a Fb: paranuclear (golgiana) (91,3%), citoplasmática (46,3%) e membranar (13%). Sarker et al. (1992) igualmente descreveu estes três padrões de marcação ao utilizar PNA e BPA em LH, assim como Moller (1984) com o uso da lectina PNA. O padrão de marcação tipo golgiano (paranuclear) característico para células RS foi observado na maioria dos casos positivos (91,3%). Este tipo de marcação, comum também na expressão de CD 15, sugere reatividade com glicoconjugados na região do Complexo de Golgi (HSU e JAFFE, 1984).

A principal função exercida pelo Complexo de Golgi é processar as proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER), removendo ou adicionando diferentes grupamentos aos mesmos, empacotá-los em vesículas dando-lhes o direcionamento final. As glicoproteínas que irão fazer parte da membrana plasmática ou dos lisossomos ou ainda de secreções exócrinas sofrem a primeira glicosilação ainda na luz do RER, na forma de um oligossacarídeo, que vai sendo “quebrado” à medida que a proteína avança no retículo em direção ao Golgi. As modificações finais da molécula ocorrem no Golgi. Tais modificações consistem de quebras das moléculas, adições de outros radicais de açúcar ou de sulfato, etc., e que são efetivadas por enzimas estrategicamente localizadas, como proteases, galactosiltransferase e sulfotransferase. A falha dessas enzimas pode resultar em alterações celulares na expressão de glicoproteínas (LELLO, 1999).

Diante da descrição da função do Complexo de Golgi, presume-se que a frutalina liga-se a resíduos de D-Galactose provavelmente presente na fase inicial do processamento de glicoproteínas em uma região próxima ou no próprio Complexo de Golgi das células RS suas variantes, justificando o predomínio do padrão de marcação golgiano.

A glicoproteína marcada pela frutalina, deve ser transformada nas fases seguintes de processamento perdendo ou alterando a ligação a este radical e conseqüentemente mostrando pouca ou nenhuma expressão em outras partes da célula (citoplasma e membrana). Este estudo não conseguiu encontrar fatores que justificassem as diferenças do padrão de marcação nos casos analisados, mas que certamente está correlacionado com alterações na expressão dos carboidratos celulares que dão características especiais e diferenciadas as células neoplásicas,

podendo ser responsável por algum evento relacionado à capacidade da célula de invasão e metástase.

A maioria dos estudos prévios publicados utilizando outras lectinas (PNA e BPA), já mostrava o padrão golgiano como característico da marcação das lectinas nas células RS e variantes (MOLLER, 1982; REE et al., 1985; SARKER et al., 1992). Porém, outros estudos mostraram resultados diferentes. Hsu e Jaffe (1985) descreveram em seu estudo com PNA que a marcação membranar era mais proeminente, apoiados por Ree, Marshal e Kadin (1984) que também utilizando a lectina PNA em LH, observaram uma marcação de superfície e citoplasmática como característica das células RS.

O presente estudo mostrou que a maioria das marcações foi fraca em relação à intensidade (tabela 17), dificultando por vezes a pronta identificação da reação. Sarker et al. (1992) em seu estudo com as lectinas PNA e BPA tiveram resultados superiores ao do presente estudo e descreveram que as células RS apresentavam marcação moderada a forte pela BPA em 96,3% dos casos. No mesmo estudo ao utilizar a PNA, os autores encontraram resultados que coincidiram com os do presente estudo, mostrando marcação forte em 43,5% dos casos. Talvez testando novas concentrações da Fb ou utilizando amplificadores da reação, tenhamos condições de melhorar a intensidade.

Em relação à especificidade, a frutalina não se mostrou um marcador exclusivo para células RS, já que outras células no linfonodo também apresentaram marcação, como macrófagos, histiócitos e células reticulares dendríticas. Vários estudos em tecidos hematopoiéticos, mostraram que a lectina PNA marca células principalmente da linhagem linfóide, que expressam o carboidrato ligante da lectina (1,3 β galactose, N-acetil-galactosamina). Em tecidos normais são marcados monócitos, centroblastos e células plasmáticas (ERBER et al, 1992). Strauchen em 1984 utilizou a lectina Con A, PNA e ASP em material de biopsia linfonodal de LH. A Con A mostrou seletiva marcação citoplasmática a histiócitos/macrófagos e nas células RS. As lectinas PNA e ASP, em contraste, marcaram linfócitos transformados e do centro germinativo e fracamente macrófagos e monócitos e não marcaram as células RS e variantes .

Porém apesar de não haver especificidade, o tipo de marcação das outras células é, em geral, citoplasmático difuso, ficando fácil o diagnóstico diferencial com as células RS que não expressaram este tipo de padrão de marcação. Os casos que tiveram marcação citoplasmática nas células RS expressaram um padrão mais localizado e não tão uniforme.

Baseados na semelhança de padrão de marcação macrófagos e histiócitos e das células RS e variantes pelas lectinas, alguns autores (REE et al, 1985; STRAUCHEN, 1984) defendiam em seus estudos a hipótese da origem histiocítica-macrofágica das células RS. Atualmente já se tem conhecimento que estas células expressam resíduos iguais ou semelhantes de D-galactose na superfície. Não existem dados suficientes para supor que tenham a mesma origem, já que a expressão do glicoconjugado e o tipo de glicosilação não são características específicas de uma única linhagem celular. Só podemos afirmar que fazem parte de um grupo de células que expressam o mesmo resíduo de carboidrato em sua superfície.

Não existem estudos publicados com o uso da frutalina na avaliação citológica ou histopatológica das células hematopoiéticas malignas ou benignas. Os estudos realizados com células hematopoiéticas até o momento utilizam a ligação da frutalina a D-galactose na estimulação de resposta imune e investiga a capacidade da frutalina induzir mitose nos linfócitos, produção de IL e migração de neutrófilos (BRANDO et al., 2002; PEREIRA et al., 2004).

O uso da frutalina associada à biotina (frutalina biotilizada), simplificou e agilizou o estudo histoquímico porque a reação é amplificada sem a necessidade do anticorpo secundário biotilizado. Foi observado também que não houve perda da sensibilidade do método, porém questiona-se se não houve perda da intensidade, já que as marcações em sua maioria foram fracas. Erber e cols. em 1992 utilizaram a mesma técnica de histoquímica biotinilando a lectina PNA para o uso em células hematopoiéticas. O estudo concluiu que a técnica era eficaz em esfregaço, tecidos fixados em formol e embebidos em parafina e tecidos congelados. O método foi considerado pelos pesquisadores como mais rápido, sensível, específico e barato do que a técnica convencional.

6.2 Correlação clínica, histológica e fenotípica da marcação pela Fb nas células RS e variantes nos LHc

6.2.1 Correlação com parâmetros clínicos

A literatura é extensa em relação aos critérios clínicos e de estadiamento que possam ser usados de forma independente para previsão de prognóstico e gravidade da doença no LH. Após revisão da literatura, foram considerados como critérios independentes de mau prognóstico, aqueles que apresentavam maior concordância entre os estudos, estavam bem definidos por grupos cooperativos de tratamento do LH e que poderiam de forma uniforme se usados para doentes com doença localizada e avançada. Foram definidos como critérios de mal prognóstico neste estudo: sexo masculino, idade > 45 anos, doença recidivada, mais de três sítios linfonodais acometidos ao diagnóstico, presença de doença extralinfonodal (medula óssea, fígado e baço), presença de doença Bulky mediastinal, estadio avançado segundo Ann Arbor (IIB, IIIA, IIIB, IVA e IVB) e resposta inicial desfavorável ao ABVD (SMOLEWSKI et al, 2000; ZANDER, WIEDENMANN, WOLF, 2002; GISSELBRECHT et al., 2005).

Nenhum estudo anterior avaliou associação da marcação de lectinas nas células RS e variantes com o prognóstico ou gravidade da doença.

Ao comparar os critérios clínicos ou de prognóstico com a positividade global pela Fb, não foi observada associação estatisticamente significativa (tabelas 9, 10 e 11).

Os carboidratos de superfície são modificados durante a diferenciação celular, transformação maligna e metástase (MUSTAC et al., 1996; SHCUMARCHER et al., 1996) e isto confere heterogeneidade estrutural celular e modificações no reconhecimento de sinais celulares alterando a função celular e em algumas situações dando características especiais à célula relacionada à invasão e metástase. Ao analisar individualmente cada padrão de marcação com os critérios de prognóstico e resposta ao tratamento, buscava-se identificar se a localização da expressão do glicoconjugado (paranuclear, citoplasmática e membranar) estaria relacionada com a facilitação dos fenômenos de invasão ou metástase. Este questionamento surgiu diante das diferenças de padrões de marcações entre os

casos, aparentemente sem justificativa técnica, levando-se em conta a função dos glicoconjugados celulares.

Comparando os padrões de marcação Fbg, Fbm, Fbc individualmente, também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas, porém é nítida a tendência de maior positividade no sexo feminino, principalmente nos padrões Fbm e Fbc (tabela 18); e nos casos com doença avançada, principalmente, no padrão Fbm (tabela 25). Não foi encontrada justificativa para este resultado no sexo feminino. Em relação a variante doença avançada, pode-se interpretar que a expressão do carboidrato D-galactose na membrana celular confira uma maior capacidade de disseminação da doença. Seria necessária uma amostra ampliada para confirmar esta hipótese. As outras tendências observadas nos demais parâmetros analisados, refletem a heterogeneidade da amostra e por isso, não foram consideradas.

Estudos anteriores com uso de lectinas na avaliação prognóstica dos LH, observaram a correlação da intensidade e tipo marcação de macrófagos e histiócitos no estroma com fatores de mal prognóstico e gravidade da doença (REE et al., 1983; 1985; 1986; 1987), mas não citam ou correlacionam a marcação das células RS e variantes com estes mesmos fatores.

No presente estudo, não houve a preocupação em relação à avaliação individual da marcação de histiócitos e macrófagos. Porém, foi observado que: existia uma marcação variável nos histiócitos; a marcação tinha sempre um padrão citoplasmático difuso uniforme e não foi observada marcação paranuclear nos histiócitos em nenhum caso.

6.2.2 Correlação com subtipos histológicos

No presente estudo não foi observada correlação estatisticamente significativa entre a positividade global e o padrão de marcação pela Fb com o subtipo histológico, mostrando que a expressão de resíduos da D-galactose na célula RS independe do tipo histológico. Estes resultados estão em concordância com a literatura já que Hsu e Jaffe (1983), Hsu, Yang e Jaffe, (1984), Strauchen (1984), Ree et al (1988) e Sarker (1992), também relataram em seus estudos que a marcação das lectinas utilizadas não mostrava associação com subtipo histológico

Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, em todos os padrões de marcação, se observou uma tendência de maior positividade nos LHEN (gráfico 2).

A diferença estatisticamente significativa do padrão de marcação Fbg em relação ao sexo (masculino) e subtipo histológico LHCM (tabela 18), foi influenciada pelo vasto predomínio de homens neste subtipo e de mulheres no LHEN, por isso não tem valor de interpretação independente em relação à marcação pela Fb.

6.2.3 Correlação com fenótipo das células RSH

No presente estudo, observamos que a positividade da amostra ao CD15 foi de 85,2%, igual à positividade global a Fb. O anticorpo monoclonal com especificidade para o CD15 se liga a um complexo grupo de glicoproteínas e glicolípídeos de superfície que tem em comum um resíduo trissacarídeo, 3-fucosil-N-acetilactosamina. A característica de marcação deste anticorpo nas células RS é membranar e para nuclear puntiforme (golgiiana). Granulócitos maduros mostram intensa marcação membranar e citoplasmática (DORFMAN et al., 1986). O carboidrato existente na estrutura do CD15 é a lactose que é formada por duas moléculas de monossacarídeos, glicose e galactose. Provavelmente a semelhança da frequência e padrão de marcação pelo CD15 com a marcação pela Fb seja porque o resíduo do carboidrato (galactose) reconhecido por estas moléculas é semelhante. A utilização dos dois marcadores aumentaria a sensibilidade de positividade da histoquímica no diagnóstico do LHc. Se analisarmos a tabela 14, apenas dois casos foram negativos para o CD15 e para a Fb concomitantemente, elevando a positividade global para 96,2% (52/54), se a associarmos a positividade pelos dois marcadores. Ree et al. (1989), já havia sugerido em seu estudo sobre a lectina PNA e LH, a utilização do painel CD15, CD30 e PNA para facilitar a identificação das células RS e variantes nos LH.

Com exceção dos resultados encontrados com a BPA (97% de positividade nas células RS) por Sarker et al. (1992), até o momento nenhuma lectina utilizada para marcação de células RS e variantes nos LHc, superaram a

marcação encontrada com o uso do anticorpo anti CD30. O presente estudo mostrou resultado semelhante à maioria dos estudos, já que a positividade global pelo CD30 na amostra foi de 98,1% superando a positividade pela frutalina (85,2%). Este fato reforça a idéia de que, por enquanto, o CD30 ainda é o melhor marcador para células RS e variantes no LHc.

Hsu e Jaffe (1983) compararam a positividade pelo CD15 (90,9%) com a marcação pela lectina PNA (59%) nos LH. Os autores concluíram que ao anticorpo monoclonal anti-CD15 era mais sensível que a lectina PNA.

Sarker e cols. (1992) compararam a marcação pelo CD15 e CD30 com as marcações pelas lectinas BPA e PNA, que foram descritas na época como marcadores padrões para histiócitos e macrófagos. O CD15 foi positivo em 13/33 casos (39,4%), o CD30 em 24/33 casos (72,7%), porcentagens muito abaixo das descritas pela literatura e das encontradas com as lectinas PNA (69,%) e BPA (97%).

Vários estudos tentam correlacionar critérios de gravidade e prognóstico, com o fenótipo variável do LHc, principalmente em relação à expressão do CD15 e CD20. A significância da expressão do CD20 e CD15 no prognóstico ainda é incerta.

Petrella e cols.(1989) sugeriram que pacientes que tinham CD15-, apresentavam curso clínico favorável, outros autores não confirmaram esta afirmação mostrando resultados contrários (VON WASIELEWSKI et al, 1997; BENHARROCH et al, 2000; VASSALO et al. , 2003).

Tzankov e cols. (2003) avaliaram a significância prognóstica da expressão do CD20 no LHc em 119 casos e a análise univariada mostrou que o grupo CD20- apresentou alta frequência de recidiva. Na análise multivariada, a expressão de CD20 foi um fator prognóstico positivo independente para sobrevida livre de eventos, porém avanços na terapêutica parecem abolir esta diferença. Contrariando este resultado, Portlock e cols. (2004) concluíram que a expressão de CD20 é um fator de mal prognóstico para sobrevida global.

Não observamos associação estatisticamente significativa entre a marcação global e os padrões de marcação pela Fb , e a expressão de CD15 e CD20. Observamos, no entanto que, todos os casos que são CD20+, também são Fb+ (tabela 15). O CD20 é uma proteína transmembrana não glicosilada expressa

em precursores B e células maduras B (PAES; CABEÇADAS, 1999), portanto o sítio de ligação não deve ser o mesmo que o da Fb. A interpretação deste dado é limitada pelo pequeno número de casos que expressam CD20 (4), sendo necessária uma amostra ampliada para verificar o real valor deste resultado.

7 CONCLUSÃO

- ✓ A amostra do estudo refletiu a mudança de comportamento observada nas últimas décadas em relação à substituição da prevalência do subtipo histológico LHCM pelo LHEN no Brasil.
- ✓ O uso da Fb, em associação com análise morfológica, pode ser útil como ferramenta para identificação das células RS e suas variantes e diagnóstico de LHc.
- ✓ A Fb não é um marcador específico para células RS. Outras células como macrófagos, histiócitos, plasmócitos e células reticulares dendríticas, mostraram marcação Fbc com padrão difuso.
- ✓ O padrão de marcação paranuclear (golgiiano) é o mais comum e característico e pode ser utilizado como parâmetro para diagnóstico diferencial entre as células RS e histiócitos, macrófagos e plasmócitos.
- ✓ Em relação aos marcadores utilizados atualmente para diagnóstico de LHc, a Fb tem positividade e marcação paranuclear semelhante ao CD15, além de vantagens em relação ao custo.
- ✓ Não existe correlação entre os subtipos histológicos de LHc e padrão de marcação pela Fb.
- ✓ Não foi observada correlação do padrão de marcação com apresentação clínica ou fatores oncobiológicos tidos como indicadores de prognóstico do LH.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Ampliar a amostra para tentar identificar correlação da marcação pela Fb com fatores prognósticos tradicionais, e sua importância no processo de progressão tumoral.
- ✓ Testar novas concentrações da Fb na tentativa de intensificar a reação.
- ✓ Avaliar o valor da Fb no diagnóstico diferencial de LH e Linfoma não Hodgkin.
- ✓ Produção da Fb em larga escala para viabilizar a comercialização.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E.S.; FERREIRA, F.V.A; ROCHA FILHO, F.D.; MENEZES, D.B; EVANGELISTA, R.M.S.P; BACCHI, M.M; BACCHI, C.E. Doença de Hodgkin infarto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com vírus de Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica, imuno-histoquímica e por hibridização in situ. **J Bras Patol** v. 33, n. 4, p.178-84, 1997.

ADDIS, B.J.; ISAACSON, P.G. Large cell lymphoma of the mediastinum: a B- cell tumor of probable thymic origin. **Histopathology**, v. 10, p. 379-90, 1986.

AGNARSSON, B.A.;KADIN, M.E. The immunophenotype of Reed- Sternberg cells.A study of 50 cases of Hodgkin's disease using fixed frozen tissue. **Cancer**, v. 63, p. 2083-2087,1989.

ÁLVARO, T.; LEJEUNE, M.; SALVADÓ, M.T.; BOSCH, R.; GARCÍA, J.F.; JAÉN, J.; BANHAM, A.H.; RONCADOR, G.; MONTALBÁN, C.; PIRIS, P.A. Can Be Predicted from the Presence of Accompanying Cytotoxic and Regulatory T Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p.1467-1473, 2005.

ANWAR, F.; WOOD, B.L. CD 44H and CD44V6 expression in different subtypes of Hodgkin Lymphoma. **Modern Pathology**, v.13, n. 10, p. 1121-1127, 2000.

ARBER, D.A. ; WEISS, L.M. CD 15: A review. **Appl Immunohistochem**, v.1, p.17-30, 1993.

AYOUB, J.P.; PALMER, J.L.; HUH, Y.; CABANILLAS, F.; YOUNES, A. Therapeutic and prognostic implications of peripheral blood lymphopenia in patients with Hodgkin's disease. **Leuk Lymphoma**, v. 34, n. 5-6, p. 519-27, 1999.

BANKS, P.M. Pathology of malignant lymphomas. In: BENTLER, E. et al. **Williams Hematology**. 5ª ed. Philadelphia: MacGraw Hill,1995. Cap. 109, p. 1049-1075.

BARROSO, G.M. **Systematica de Angiosperma no Brasil**. São Paulo: EDUSP, v. 1,1978.

BASIC-JUKICI, N.; BASIC-KORECTI, M. ;RADMAN, I.; LABAR, B. Reed-Sternberg cells in the pathogenesis of Hodgkin's disease. **Acta Med Croatica**, v. 55,n. 3, p. 115-21, 2001.

BEARMAN, R.M.; PANGALIS; GARAPPAPORT, H. Hodgkin's disease lymphocyte depletion type. A clinicopathologic study of 39 patients. **Cancer**, v. 41, n. 293-302, 1978.

BENHARROC, D.; DIMA, E.; LEVY, A.; OHANA-MALKA, O.; ARIAD, S.; PRINSLOO, I.; MEJIROVSKY, E.; SACKS, M.; GOPAS, J. Differential expression of sialyl and non-sialyl CD15 antigens on Hodgkin-Reed-Sternberg cells: significance in Hodgkin's disease. **Leukemia Lymphoma**, v. 39, n. 1-2, p. 185-194, 2000.

BIGNI, R. Linfoma de Hodgkin. In: Tipos de Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 20/01/2005.

BITTENCOURT, A. C. L.; MENDONÇA, N.; CARVALHO, E. G.; BITTENCOURT, A. R. L.; NUNES, CARLOS A . S. Doença de Hodgkin infantil na Bahia, Brasil: avaliação de 43 casos. **J pediatr (Rio de Janeiro)**, v. 62, n. 5, p. 187-91,1987.

BJÖRKHOLM, M.; HOLM, G.; DE FAIRE, U.; MELLSTED, H. Immunological defects in healthy twin siblings to patients with Hodgkin's disease. **Scand J Haematol**, v. 19, n. 4, p. 396-404, 1977.

BORING, C.C.; SQUIRES, T.S.; TONG, T. Cancer statistics.1993. **Ca Cancer J Clin**, v. 43, p. 7-26, 1993.

BRANDO-LIMA, A.C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; HENRIQUES, M.G.; MONTEIRO – MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 208, n. 2, p. 145-54, 2005.

BRASIL.Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. **Diretrizes e normas para pesquisa em seres humanos**. Disponível em:<[http:// www.bioetica.ufrgs.br](http://www.bioetica.ufrgs.br) >. Acesso em: 21/02/2005.

BRÄUNINGER, A.; HANSMANN, M.L.; STRICKLER, J.G., DUMMER, R.; BURG, G.; RAJEWSKY, K.; KUPPERS, R. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non- Hodgkin's Lymphoma. **Massachussetts Medical Society**, 1999.

BRINK, A.A.; OUDEJANS, J.J.; VAN DEN BRULE, A.J.; KLUIN, P.M.; HORSTMAN, A.; OSSENKOPPELE, G.J.; VAN HEERDE, P.; JIWA, M.; MEIJER, C.J. Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance? **Mod Phatology**, v. 11, n. 4, p. 376-383,1998.

BROOKS, S.A. The envolviment of *Helix pomatia* (HPA) biding N-acetylgalactosamine glicans in cancer progression. **Histol Histopathol**, v.15, n. 1, p. 143-158, 2000.

BUNN-MORENO, M.M.; CAMPOS-NETO, A. Lectins extracted from seeds of *Artocarpus intergrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulators of dsitintic human T and B cell functions. **The Journal of Immunology**, v. 127, n. 2, p. 427-429, Aug., 1981.

BURKE, J.S. Hodgkin's disease: histopathology and differential diagnosis. In: Knowles, D.M. **Neoplastic Hematopathology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1992, cap. 16, p. 497-533.

CAMILLERI-BROËT, S.; FERMÉ, C.; BERGER, F.; LEPAGE, E.; BAIN, S.; BRIÈRE, J.; MARMEY, B.; GAULARD, P.; AUDOUIN, J. Ti A1 in advanced-stage classical

Hodgkin's lymphoma: no prognostic impact for positive tumour cells or number of cytotoxic cells. **Virchows Arch**, v. 445, n. 4, p. 344-6, 2004.

CAMMUE, B.P.A.; PEETERS, B.; PEAUMANS, W.J. A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs. **Planta**, v. 169, n. 4, p. 583-588, 1986.

CARBONE, P.P.; KAPLAN, H.S.; MUSSHOF, K.; SMITHERS, D.W.; TUBIANA, M. Report of committee on Hodgkin's disease staging classification. **Cancer Res**, v. 31, n. 1, p. 1860-1867, 1971.

CARDE, P.; HAGENBEEK, A.; HAYAT, M.; MONCONDUIT, M.; THOMAS, J.; BURGERS, M.J. et al. Clinical staging versus laparotomy and combined modality with MOPP versus ABVD in early-stage Hodgkin's disease: the H6 twin randomized trials from the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group. **J Clin Oncol**, v. 11, p. 2.258-2.272, 1993.

CARTWRIGHT, R.A.; WATKINS, G. Epidemiology of Hodgkin's disease: a review. **Hematol Oncol**. v.22, n. 1, p. 11-26, 2004.

CHAN, J.K.C. The New World Health Organization Classification of Lymphomas: The past, the present and future. Review Article. **Hematological Oncology**, v. 19, n. 4, p. 129-150, 2001

CHANG, K.L.; ALBUJAR, P.F.; CHEN, Y.Y.; JOHNSON, R.M.; WEISS, L.M. High prevalence of Epstein- Barr virus in the Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. **Blood**, v. 81, p. 4966-501, 1993.

CHITTAL, S.M.; CAVERIVIERE, P.; SCHWARTING, R. Monoclonal antibodies in the diagnosis of Hodgkin's disease. The search for a rational panel. **Am J Surg Pathol**, v. 12, p. 9-12, 1988.

CHRONOWSKI, G. M.; WILDER, R.B.; TUCKER, S. L.; HA, C.S.; HAGEMEISTER, F. B.; BARISTA, I.; HESS, M. A., CABANILLAS, F.; COX, J. D. An elevated serum beta2 microglobulin level is an adverse prognostic factor for overall survival in patients with early stage Hodgkin's disease. **Cancer**, v. 95, n. 12, p. 2534-2538, 2002.

CHU, P.G., CHANG, K.L., ARBER, D.A., WEISS, L.M. Immunophenotyping of hematopoietic neoplasms. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 17, n. 3, p. 236-256, 2000.

COLBY, T.V.; HOPPE, R.T.; WARNKE, R.A. Hodgkin's disease: A clinicopathologic study of 659 cases. **Cancer**, n. 49, v. , p. 1848-1858, 1981.

COPPLESON, L.W.; RAPPAPORT, H.; STRUM, S.B.; ROSE, J. Analysis of the rye classification of Hodgkin's disease: The prognostic significance of cellular composition. **J Nat Cancer Inst**, n. 51, p. 379-390, 1973.

CORREIA, P.; O'CONNOR, G.T. Epidemiology patterns of Hodgkin's disease. **Int J Cancer**, v. 8, p. 192-2001, 1971.

DE VITA, V.T. Lymphocyte reactivity in Hodgkin's disease. A lymphocyte civil war. **N Engl J Med**, v. 289, p. 801-802, 1973 (apud MACEDO, M.P.) in Doença de Hodgkin: revisão; Parte II. Biologia celular. **Arq Bras Med**, v. 63, n. 3, p. 213-215, 1989.

DIECKEMANN, K.; PÖTTER, R.; HOFMANN, J.; WAGNER, W.; SCHELLONG, G. Does bulky disease at diagnosis influence outcome in childhood Hodgkin's disease and require higher radiation doses? Results from the German-Austrian Pediatric Multicenter Trial DAL-HD-90. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 56, n. 3, p. 644-652, 2003.

DOGGETT, R.S.; COLBY, T.V.; DORFMAN, R.F. Interfollicular Hodgkin's disease. **Am J Surg Pathol**, v. 7, p. 145-9, 1983.

DORFMAN, R.F.; GATTER, K.C.; PULFORD, K.A.F. ; MASON, D.Y. An evolution of the utility of anti-granulocyte and anti-leucocyte monoclonal antibodies in the diagnosis of Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, v. 123, p. 5008-519, 1986.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J Biol Chem**, v. 263, p. 9557-9560, 1988.

EKSTRAND, B.C.; HORMING S.J. Hodgkin's disease. **Blood Reviews**, v.16, p.111-117, 2002.

ENBLAD, G.; SUNDSTRON, C.; GLIMERLIUS, B. Imunohistochemical characteristics of Hodgkin and Reed- Sternberg cells in relation to age and clinical outcome. **Histopathology**, v. 22, p. 535-541, 1993.

ERBER, W.N.; ASBAHR, H.; MEYER, B.; HERRMANN, R.P.; DAVIES, J.M. Peanut agglutinin (Lectin from *Arachis Hypogaea*) binding to hemopoietic cells: An Immunophenotypic study using a biotin streptavidin technique. **Pathology**, v. 24, n. 3, p. 173-176, 1992.

FERREIRA, F.V.A.; OLIVEIRA, E.G.; ALENCAR, J.E.B. Doença de Hodgkin: peculiaridades estatísticas em Fortaleza, Ceará, Brasil. **Rev Med Univ Fed Ceará**, v. 17, p. 15-18, 1977.

FERREIRA, M.V.P. Frutalina, lectina α -D galactose ligante de *Artocarpus incisa* L: Um novo marcador celular no estudo da progressão tumoral no câncer de mama humano. **Tese para obtenção do título de Doutor em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2001.

FERRY, J.A.; LINGGOOD, R.M.; CONVERY, K.M.; EFIRD, J.T.; ELISEO, R.; HARRIS, N.L. Hodgkin disease, nodular sclerosis type. Implications of histologic classification. **Cancer**, v. 71, p. 457-63, 1993.

FISCHER, M.; BIJMAN, M.; MOLIN, D.; CORMONT, F.; UYTETHNOVE, C.; VAN SNICK, J.; SUNDSTRÖM, C.; ENBLAD, G.; NILSSON, G. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. **Leukemia**, v. 17, n. 12, p. 2513-2516, 2003.

FLAVELL, K.J.; BILLINGHAM L.J.; BIDDULPH, J.P.; FLAVELL, J.R.; CONSTANDINOU, C.M.; YOUNG, L.S.; MURRAY, P.G. The effect of Epstein – Barr virus on outcome in age and sex defined subgroups of patients with advanced disease. **Ann Oncol**, v. 14, n.2, 282-290, 2003.

GISSELBRECHT, C.; MOUNIER, N.; ANDRÉ, M.; CASANOVAS, O.; REMAN, O.; SEBBAN, C.; DIVINE, M.; BRICE, P.; BRIERE, J.; HENNEQUIN, C. How to define intermediate stage in Hodgkin's lymphoma? **Eur J Haematol Suppl**, v. 66, p. 111-4, 2005.

GLAVINA-DURDOV, M.; JAKIC-RAZUMOVIC, J.; CAPKUN, V.; MURRAY, P. Assessment of prognostic impact of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 expression in Hodgkin disease. **The British Journal of Cancer**, v. 84, n. 9, p.1227-1234, 2001.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M. ; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, n. 5760. p. 66, 1980.

GOWN, A.M.; WEVER, N.; BATTIFORA, H. Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. **Appl. Immunohistochem**, v. 1, p. 256-66, 1993.

HALUSKA, F. G.; BRUFSKY, A. M; CANELLOS, G. P. The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. **Blood**, v. 84, p. 1005-19, 1994.

HANSMANN, M. L.; WILLENBROCK, K. WHO classification of Hodgkin's lymphoma and its molecular pathological relevance. **Pathologe**, v. 23, n. 3, p. 207-218, 2002.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H.K.; VARDINAN, J.; LISTER, T. A.; BLOOMFIELD, C. D. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997, **Journal of Clinical Oncology**, v.17, p. 3835-49, 1999.

HASENCLEVER, D.; DIEHL, V.A. prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. **N Engl J Med**, v. 339, n.21, p.1506-14, 1998.

HAZAR, B.; POLAT, G.; SEYREK, E.; BAGDATOGLU, O.; KANIK, A.; TIFITIK, N. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 e MMP-9) in Hodgkin's and non- Hodgkin's lymphoma. **Int J Clin Pract**, v. 58, n. 2, p. 139-143, 2004.

HSU, S. M.; JAFFE, E. S. Leu M1 and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's disease. **Am J Clin Pathol**,v. 82, n. 2, p. 29-32, 1984.

HSU, S. M.; YANG, K; JAFFE, E. S. Phenotypic expression of Hodgkin's and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **Am J Pathol** , v. 118, n. 2, p. 209-217, 1985.

HUDSON, M.M.; DONALDSON, S. S. Hodgkin's Disease. In: PIZZO, P. A.; POPLACK, D. G.; editors. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. 4rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2002. p.637-660.

HUGES, R.C. Lectins as cell adhesion molecules. **Curr Opin Struct Biol**, v.2, p.687-692, 1992.

HUMMEL, M.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; DALLENBACH, F.; KORBJUHN, P.; DIMMLER, C.; STEIN, H. EBV infection patterns in Hodgkin's disease and normal lymphoid tissue. Expression and cellular localization of EBV gene products. **Br J Haematol**, v. 82, p. 689, 1992.

ITO, N.; YOKOTA, M.; KAWAHARA, S.; NAGAIKE, C.; MORIMURA, Y.; HIROTA, T.; MATSUNAGA, T. Histochemical demonstration of different types of poly-N-acetyllactosamine structures in human thyroid neoplasms using lectins and endo- β -galactosidase digestion. **Histochemical Journal**, v. 27, n. 8, p. 620-629, 1995.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; WARD, E.; SAMUELS, A.; TIWARI, R. C.; GHAAHOR, A., FEUER, E. J.; THUN, M. J. Cancer Statistics, 2005 **CA A Cancer Journal Clinicians**, v.55, p.10-30, Jan., 2005. Disponível: <<http://caonline.amcancersoc.org>>. Acesso em 15/06/2005.

KANT, J.A.; HERBBARD, S.M; LONGO, D.L.; SIMON, R.M.; DEVITA JR, V.T; JAFFE, E.S. The pathologic and clinical heterogeneity of lymphocyte-depleted Hodgkin's disease. **J Clin Oncol** , v. 4, p. 284-294, 1986.

KAPLAN, H.S. **Hodgkin's diseases**, Cambridge MA, Harvard University Press, 2^o edition, 1980.

KASPERS, G. J.; VEERMAN, A. J.; VAN WERING, E. R.; VAN DER LINDEN-SCHEREVEER, B. E.; VAN ZANTWIJK, C.H.; VAN DER DOES-VAN DEN BERG, A. ; PIETERS, R. Prognostic significance of peanut agglutinin binding in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 10, n. 4, p. 675-681, 1996.

KENNEDY, B.J.; FREMGEN, A. M.; MENCK, H. R. The national cancer data base report on hodgkin's disease for 1985-1989 and 1990-1994. **Cancer**, v. 83, n.5, p. 1041-1047, 1998.

KORKOLOPOULOU, P.; THYMARA, I.; KAVANTZAS, N.; VASSILAKOPOULOS, T. P.; ANGELOPOULOU, M. K.; KOKORIS, S. I.; DIMITRIADOU, E. M.; SIAKANTARIS, M. P.; ANARGYROU, K.; PANAYIOTIDIS, P.; TSENGA, A.; ANDROULAKI, A.; DOUSSIS-ANAGNOSTOPOULOU, I. A.; PATSOURIS, E.; PANGALIS, G. A. Angiogenesis in Hodgkin's lymphoma: a morphometric approach in 286 patients with prognostic implications. **Leukemia**, v. 19, n. 6, p. 894-900, 2005.

KUITTINEN, O.; SOINI, Y.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Diverse role of MMP-2 and MMP-9 in the clinicopathological behavior of Hodgkin's lymphoma. **Eur J Haematol**, v. 69, n. 4, p. 205-12, 2002.

KURZROCK, R.; REDMAN, J.; CABANILLAS, F.; JONES, D.; ROTHBERG, J.; TALPAZ, M. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. **Cancer Res.**, v. 53, n. 9, p. 2118-22, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANZKOWSKY, P. Hodgkin Disease. In: **Manual of Pediatric Hematology and Oncology**. 4^a ed. California: Elsevier Academic Press; 2005. p. 453-490.

LELLO, E. A célula normal. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia – Processos Gerais**. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap.1, p. 1-21.

LEVI, L.M. Hodgkin's disease in black zimbabweans. **Cancer**, v.61, p.189-94, 1988.

LEVY, A.; ARMON, Y.; GOPAS, J.; ARIAD, S.; PRINSLOO, I.; SHPILBERG, O.; KAPELUSHNIK, J.; SACKS, M.; BENHARROCH, D. Is classical Hodgkin's disease indeed a single entity? **Leukemia and Lymphoma**, v.43, n.9, p.1813-1818, 2002.

LINK, P.M.; DONALDSON, S.S. The Lymphomas and Lymphadenopathy. In: NATHAN, D.G.; OSKI, F.A. **Hematology of Infancy and Childhood**. 4rd ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company,1993, p.1334-1345.

LOUREIRO, M.M.; MORAIS, J.C.; MILITO, C.B.; PORTUGAL, R.D.; PULCHERI, W.; SPECTOR, N. Expressão do vírus Epstein-Barr em pacientes com doença de Hodgkin: relato de 64 casos do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 1, p. 37-40, 2004.

MACEDO, M.P. Doença de Hodgkin: revisão; Parte I. Epidemiologia. **Arq Bras Med**, v. 62, n. 6, p. 433-435, 1988.

_____. Doença de Hodgkin: revisão; Parte II. Biologia celular. **Arq Bras Med**, v. 63, n. 3, p. 213-215, 1989.

_____. Doença de Hodgkin: revisão; Parte IV. Imunologia. **Arq Bras Med**, v. 64, n. 3, p. 172-6, 1990.

MARRETT L.D.,FROOD J.,NISHRI D., UGNAT, A . M.Cancer in Young Adults in Canada (CYAC) Working Group. Cancer incidence in young adults in Canada: preliminary results of cancer surveillance project. **Chronic Dis Can.**, v. 23, p. 58-64,2002.

MARTINEZ, M.D.C.J.; MARQUEZ, H.T. ; LAUSCURAIN, R.; ZENTENO, E.; SANCHES, A .H.; IBARRA, J.L.R.; CHAVEZ, R. Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias do México**, v. 15, n. 1, p. 39-47, 2002.

MELO-JUNIOR, M.R.; TELLES, A.M.S.; ALBUQUERQUE, F.E.B.; ALBUQUERQUE, F.E.B.; PONTES-FILHO, N.T.; CARVALHO JR., L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Altered

lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 2, p. 123-125, 2004.

MENESTRINA, F.; CHILOSI, M.; SCARPA, A. Nodular lymphocyte predominant Hodgkin's disease and anaplastic large- cell (CD 30+) lymphoma: distinct entities or nonspecific patterns? **Semin Diagn Pathol**, v. 12, p. 256-69, 1995.

MEYER, R.M.; AMBINDER, R.F.; STROOBANTS, S. Hodgkin's lymphoma: evolving concepts with implications for practice. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)**, p. 184-202, 2004.

MILHOME, M.V. Frutalina, Lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L., no estudo do câncer de tireóide humana. Análise comparativa com a galectina-3. **Tese para obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará**, 2003.

MILHOME, M.V.; MOREIRA, R.; FERREIRA, F.V.; SCHMIT, F.C. **Frutalin, - Galactoside-Binding Lectin, as a Tumoral Marker in Thyroid Lesions. A Comparative Study with Galectin-3, Cytokeratin-19 and HBME-1.** Trabalho apresentado no 2º Congresso Internacional de Patologia, Foz de Iguaçu, Brasil, 9-13 de Junho, 2004. Não publicado.

MODY, R.; JONSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, n.1, p.1-10,1995.

MÖLLER, P. Peanut lectin: A useful tool for detecting Hodgkin cells in paraffin sections. **Virchows Arch [Pathol Anat]**, v. 396, p. 313-317,1982.

MONTALBÁN, C.; ABRAIRA, V.; MORENTE, M.; ACEVEDO, A.; AGUILERA, B.; BELLAS, C.; FRAGA, M.; DEL MORAL, R.G.; MENARGUEEZ, J.; OLIVA, H.; SANCHES-BEATO, M.; PIRIS, M.A. Epstein-Barr vírus-latente membrane protein 1 expression has a favorable influence in the outcome of patients with Hodgkin's disease treated with chemotherapy. **Leukemia and Lymphoma**, v. 39, n. 5-6, p. 563-572, 2000.

MONTALBÁN, C.; GARCIA, J.F.; ABRAIRA, V.; CAMACHO, L.G.; MORENTE, M.M.; BELLO, J.L.; CONDE, E.; CRUZ, M.A.; SANZ, R.G.; LARÑA, J.G.; LLANOS, C.G.M.; MARTINEZ, R.; FLORES,E.; MÉNDEZ, M.; CONCEPCIÓN, P.; CONCEPCIÓN, R.; GODOY, P.S.; ZAMORA, J.; PIRIS, M.A.A. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: A study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 9, p. 1664-1973, 2004.

MONTEIRO, A.C.O. **Características físicas, químicas e estruturais da frutalina: Uma lectina D-galactose ligante de *Artocarpus incisa*.** Tese para obtenção do título de Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 1998.

MONTEIRO–MOREIRA, A.C.O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de**

fruta-pão (*Artocarpus incisa L.*). Tese para obtenção do título de Doutor em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MOREIRA, R.A. **Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química**. Tese para Professor Titular da Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 1998.

MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Plants lectins, chemical and biological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, Suppl II, p. 211-218, 1991.

MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T. A. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. **Biologia Plantarum**, v. 25, n. 5, p. 336-342, 1983.

MORTARA, R.; CHAMMAS, R.; OBA, S.; NADERSANG, H.; SANG, W. H. **Adesão Celular, Glicosilação e Câncer**. Disponível :< <http://www.saude.br/dmip/roger/htm> >. Acesso em 11/08/2005.

MUSTAC, E.; MELATO, M.; SASSO, F. The lectin binding sites for peanut agglutinin in invasive breast ductal carcinomas and their role as prognostic factor. **Cancer Res Clin Oncol**, v.122, n.11, p. 693-697, 1996.

NEIMAN, R.S.; ROSEN, P.J.; LUKES, R.J. Lymphocyte- depletion Hodgkin's disease. A clinicopathological entity. **N Engl J Med**, v. 288, p. 751-5, 1973.

OLIVEIRA, D.E.; BACCHI, M.M. ; ABREU, E.S.; NIERO-MELO, L.; BACCHI, C.E. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, n. 1, p. 25-30, 2002.

OUDEJANS, J.J.; JIWA, N.M.; KUMMER, J.A.; OSSENKOPPELE, G.J.; VAN HEERDE, P.; BAARS, J.W.; KLUIN, P.M.; KLUIN-NELEMANS, J.C.; VAN DIEST, P.J.; MIDDELDORP, J.M.; MEIJER, C.J. Activated cytotoxic T cells as prognostic marker in Hodgkin's disease. **Blood**, v. 89, n. 4, p.1376-82, 1997.

PAES, R.A.P.; CABEÇADAS, J. Linfoma de Hodgkin. In: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de Imunohistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. Cap.14, p. 152-159.

PARKIN, D.M.; BRAY F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer Journal of Clinicians**, v. 55, p. 74 – 108, Mar., 2005. Disponível:<<http://caonline.amcancersoc.org>>. Acesso em 15/06/2005.

PEREIRA, C.; LIMA, A.B.; GAMA, R.S.; SAMPAIO, A.; HENRIQUES, M.G.; MOREIRA, A.; MOREIRA, R.A. ; BARJA-FIDALGO, C. **Involvement of AKT and NF kappa-B on lymphocyte activation by frutalin, a galactose-binding lectin**. Nitric Oxide, Cytokines and Inflammation-An International Symposium. Copacabana Palace-Jun/2004-Rio de Janeiro-RJ-Brasil.

PETRELLA, T.; MICHIELS, J.F.; COLLIN, F.; ABHOLTZ, J.M.; FRIEDMAN, S.; FARGOT, P. CD 15 antigen in Hodgkin's disease. **Pathol Res Pract**, v. 185, p. 886-890, 1989.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. The role of lectins in plant defence. **Histochem J**, v. 27, n. 4, p. 253-71, 1995.

PINTO, M.T. **Análise comparativa da associação do vírus de Epstein-Barr com o Linfoma de Hodgkin Clássico em adulto. Estudo por imunohistoquímica e hibridização in situ de casos do Ceará (Brasil) e França.** Dissertação para obtenção do título de Mestre em Patologia pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

PITOMBEIRA, M.S. et al. Doença de Hodgkin na infância e na adolescência. **Rev Hosp Clín Fac Med S Paulo**, v. 42, p. 253-9, 1987.

POPPEMA, S. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease. **Semin Diagn Pathol**, v. 9, n. 4, p. 257-64, 1992.

PORTLOCK, C.S.; DONNELLY, G.B.; QIN, J.; STRAUS, D.; YAHALON, J.; ZELENETZ, A.; NOY, A.; O'CONDOR, O.; HORWITZ, S.; MOSKOWITZ, C.; FILIPPA, D.A. Adverse prognostic significance of CD20 positive Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin's disease. **Br J Haematol**, v. 125, n. 6, p. 701-78, 2004.

PRACCHIA, L.F.; BUCCHERI, V.; MENEZES, Y.; SIQUEIRA, S.C.A.; MORI, N.S.; CHAMONE, D.A.F. Significado prognóstico dos graus histológicos do linfoma de Hodgkin do tipo esclerose nodular. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41 n. 5, 2005.

PROCTOR, S.J.; TAYLOR P.; MACKIE, M.J.; DONNAN, P.; BOYS, R.; LENNARD, A.; PRESCOTT, R.J. A numerical prognostic index for clinical use in identification of poor risk patients with Hodgkin's diseases at diagnosis. **Leukemia and Lymphoma**, v. 7, p. 17-20, 1992.

PROVENCIO, M.; CORBACHO, C.; SALAS, C.; MILLAN, I.; ESPANA, P.; BONILLA, F.; CAJAL, S.R. The topoisomerase II alpha expression correlates with survival in patients with advanced Hodgkin's lymphoma. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 14, p. 5430-5431, 2003.

RAIDA, L.; PAPAJÍK, T.; HLUSÍ, A.; FABER, E.; URBANOVÁ, R.; HECZKO, M.; JANCÍKOVÁ, M.; ZAPLETALOVÁ, J.; KOMENDA, S.; INDRÁK, K. Importance of determination of serum beta-2-microglobulin levels in patients with Hodgkin's lymphoma. **Vnitr Lek**, v. 48, n. 2, p. 91-5, 2002.

REE, H. J. Concanavalin A – binding histiocytes in Hodgkin's disease. A predictor of early relapse. **Cancer**, v. 58, n. 1, p. 87-95, 1986.

REE, H. J. Stromal macrophage-histiocytes in Hodgkin's disease. Their relation to fever. **Cancer**, v. 60, n. 7, p. 1479-1484, 1987.

REE, H. J.; CROWLEY, J. P. Concanavalin A binding histiocytes in Hodgkin's disease and their relation to clinicopathologic features of disease. **Cancer**, v. 52, n. 2, p. 252-257, 1983.

REE, H. J.; HSU, S.M. Lectin histochemistry of malignant tumors. Peanut agglutinin (PNA) receptors in Follicular lymphoma and follicular hyperplasia: An immunohistochemical study. **Cancer**, v. 51, p. 1631-1638, 1983.

REE, H.J.; KADIN, M.E. Macrophage-histiocytes in Hodgkin's disease: The relation of peanut agglutinin binding macrophage-histiocytes to clinicopathologic presentation and course of disease. **Cancer**, v.56, n. 2, p. 333-338, 1985.

REE, H.J.; NEIMAN, R.S.; MARTIN, A.W.; DALLENBACH, F.; STEIN, H. Paraffin section markers for Reed-Sternberg cells: A comparative study of Peanut agglutinin, Leu-M1, LN2 and Ber-H2. **Cancer**, v.63, n. 10, p. 2030-2036, 1989.

REYNOLDS, G.M.; BILLINGHAM, L.J.; GRAY, L.J.; FLAVELL, J. R.; NAJAFIPOUR, S.; CROCKER, J.; NELSON, P.; YAOUNG, L.S.; MURRAY, P.G. Interleukin 6 expression by Hodgkin's/Reed Sternberg cells is associated with the presence of B symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease. **Br J Haematol**, v. 118, n. 1, 195-201, 2002.

ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAMPOS-NETO, A. Jacalin: An IgA binding lectin. **The Journal of Immunology**, v. 134, n. 3, p.1740-1743, 1985.

RUDGIER, H.; GABIUS, H.J. Plant Lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate J.**, v. 18, p. 589-613.

SAID, JW. The immunohistochemistry of Hodgkin's disease. **Sem Diagn Pathol**, v. 9, p. 265-71, 1992.

SALGAMI, E.V.; EFSTATHIOU, S.P.; VLACHAKIS, V.; SEKARA, E.V.; SYRIGOS, K. N.; ROUSSOU, P.P. High pretreatment interleukin-10 is an independent predictor of poor failure-free survival in patients with Hodgkin's lymphoma. **Haematologia**, v. 32, n. 4, p. 377-87, 2002.

SANKARANARYANAN, R., SEKAR, K.; BANERJEE, R.; SHARMA, V.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moracea plan lectin with a b-prism fold. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 7, p. 596-603, 1996.

SANTOS, R.O. ; DIAS, M.B.; THOMAZ, S.M.O. ; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus intergrifolia*. **The J Immunol**, v. 153, p. 1798-1807, 1994.

SARKER, A.B., AKAGI, T., JEON, H.J., MIYAKE, K., MURAKAMI, I., YOSHINO, T., TAKAHASHI, K., NOSE, S. *Bauhinia purpurea* – A new paraffin section marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, v. 141, n. 1, p. 19-23, 1992.

SCHAEFER, R.L.; KELLER, K.F.; DOYLE, R.J. Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutinin for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. **J Clin Microbiol**, v. 10, n.5, p. 669-672, 1979.

SCHMID, C.; PAN, L.; DISS, T.; ISAACSON, P.G. Expression of B-cell antigen by Hodgkin's disease and Reed- Sternberg cells. **Am J Pathol**, v. 1399, p. 701-707, 1991.

SCHMITT, F.C.; MARINO, A. Amendoeira I. Expression of Sialyl-Tn in fine needle aspirates from mammographically detected breast lesions: A marker of malignancy? **Diagnostic Cytopathology**, v. 18, n. 5, 1998.

SCHUMACHER, U.; ADAM, E.; BROOKS, S. A.; LEATHERM, A. J. The use of *Helix pomatia* agglutinin in metastasis research. **Biochemistry**, v. 11, p. 307-310, 1996.

SEITZ, V.; HUMMEL, M.; MARAFIOTI, ANAGNOSTOPOULOS, I.; ASSAF, C.; STEIN, H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. **Blood**, v. 95, p. 3020-3024, 2000.

SEYMOUR, J.F.; TALPAZ, M.; HAGEMEISTER, F.B.; CABANILLAS, F.; KURZROCK, R. Clinical correlates of elevated serum levels of interleukin 6 in patients with untreated Hodgkin's disease. **Am J Med**, v. 102, n. 1, p. 21-8, 1997.

SHARON, N. Glycoproteins now and then: A personal account. **Acta Anatomica**, v. 161, n. 1-4, p. 7-17, 1998.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins cell agglutinating and sugar – specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-958, 1972.

SIEBER, M., ENGERT, A., DIEHL, V. Treatment of Hodgkin's disease: results and current concepts of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. **Ann Oncol**, v. 11 Suppl 1, p. 81-85, 2000.

SMITH, R.S.; CHEN, Q.; HUDSON, M. M.; LINK, L.; WEINSTEIN, H.; BILLET, A. ; MARCUS, K. J.; TARBELL, N. J.; DANALDSON, S.S. Prognostic factors for children with Hodgkin's disease treated with combined modality therapy. **J Clin Oncol**, v.21, n. 10, p. 2026-2033, 2003.

SMOLEWSKI, P.; ROBAK, T.; KRYKOWSKI, E.; MORAWIEC, M.B.; NIEWIADOMSKA, H.; PLUZANSKA, A.; CHMIELOWOSKA, E.; ZAMBRANO, O. Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single institution. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 1150-1160, 2000.

SOUZA, C. A.; BECHELLI, A. P. P.; SCHETTERT, I.T.; METZE, I. L.; VASSALLO, J. Contribuição ao conhecimento clínico, epidemiológico e histopatológico da doença de Hodgkin, em uma população brasileira. **Bol Soc Bras Hematol Hemoter**, v. 19, n. 174, p. 3-15, 1997.

SPECTOR N. Abordagem atual dos pacientes com Doença de Hodgkin. **Rev bras hematol hemoter**, v. 26, n.1, p. 35-42, 2004.

SPECTOR, N.; COSTA, M.A.; PULCHERI, W.; SALGADO, R.C.; NUCCI, M.; ANDRADE, C.A.; MORAIS, J.C.; CASTRO, O.; SCALETSKY, A.F.; BRABO, E. C-MOPP/ABV yields good results in a public hospital population with Hodgkin's disease in Brazil. **Cancer**, v. 71, n. 9, p. 2823-2827, 1993.

STEIN, H.; DELSOL, G.; SAID, J.; MANN, R.; POPPEMA, S.; JAFFE, E. S.; SWERDLOW, S. Hodgkin's Lymphoma. In: JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J.W. (eds.) **Pathology and genetics tumors of hematopoietic and lymphoid system**. World Organization Classification of Tumors. IARC Press; Lyon, 2001. Chapt 8, p. 244-253.

STRAUCHEN, J.A. Lectin receptors as Markers of lymphoid cells: II Reed – Sternberg cells share lectin-binding properties of monocyte e macrophages. **Am J Pathol**, v. 116, n. 3, p. 370-376, 1984.

SUP, S.J.; ALEMAÑY; C.A.; POHLMAN, B.; ELSON, P.; MALHI, S.; THAKKAR, S.; STEINLE, R.; HSI, E.D. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. **J Clin Oncol**, v.23, n. 16, p. 3773-9, 2005.

TAVARES, R.O. **Galactomanana de *Adenantha pavonina* L.: Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

TEN BERGE, R.L.; OUDEJANS, J.J.; DUKERS, D.F.; MEIJER, J.W.; OSSENKOPPELE, G.J.; MEIJER, C.J. Percentage of activated cytotoxic T-lymphocytes in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin's disease: An independent biological prognostic marker. **Leukemia**, v.15, n. 3, p.458-64, 2001.

THOMAS, R.K.; RE, D.; WOLF, J.; DIEHL, V. Part I: Hodgkin's lymphoma – molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Lancet Oncol**, v. 5, n. 1, p. 11-18, 2004.

TÓTH, J.; DWORÁK, O.; SUGÁR, J.Z. Eosinophil predominance in Hodgkin's disease. **Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol**, v. 89, n. 1, p. 107-11, 1977.

TRINDADE, M.B. **Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas lectinas ligantes de quitina de sementes do gênero *Artocarpus***. Dissertação de Doutorado em Física aplicada no Instituto São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

TZANKOV, A.; KRUGMANN, F. F.; FISCHHOFER, M.; GREIL, R.; DIRNHOFER, S. Prognostic significance of CD20 expression in classical Hodgkin's lymphoma: A clinicalpathological study of 119 cases. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 4, p. 1381-1386, 2003.

URDIALES-VIEDMA, M.; DE HARO-MUNÓZ, S.; MARTOS-PADILLA, S.; ABAD-ORTEGA, J. M.;VARELA-DURÁN, J.; GRANDA-PAEZ, R. Jacalin, another marker for histiocytes in paraffin embedded tissues. **Histopathology**, v. 10, p. 597-602, 1995.

VAN DAMME, E.J.M.; BALZARINI, J.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The monomeric and dimeric mannose-binding proteins from the Orchidaceae species *Listeria ovata* e *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities. **Glycoconjugate Journal**, v. 11, n. 4, p. 321-332, 1994.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTIEN, I.J.; PEUMANS, W.J. Havein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta cell**, v. 183, n. 2, p. 258-264, 1991.

VASSALLO, J.; METZE, K.; TRAINA, F. S.; LORAND-METZE, I. The prognostic relevance of apoptosis-related proteins in classical Hodgkin's lymphomas. **Leuk Lymphoma**, v. 44, n. 3, p. 483-8, 2003.

VASSALLO, J.; METZE, K.; TRAINA, F.S.; SOUZA, C.A.; LORAND-METZE, I. Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients. **Haematologica**, v. 86, n. 1, p. 227-8, 2001.

VASSALLO, J.; PAES, R.P.; SOARES, F.A .; MENEZES, Y.; ALDRED, V.; RIBEIRO, K.C.B.; ALVES, A.C. Histological classification of 1025 cases of Hodgkin's lymphoma from the state of São Paulo, Brasil. **São Paulo Med J**, v. 123, n. 3, p. 134-136, 2005.

VASSILOKOPOULOS, T.P.; ANGELOPOULOU, M.K.; SIANTARIS, M.P.; KONTOPIDOU, F.N.; DIMOPOULOU, M.N.; BARBOUNIS, A.; GRIGORAKIS, V.; KARKANTARIS, C.; ANARGYROU, K.; CHATZIOANNOU, M., ROMBOS, J.; BOUSSIOTIS, V.A .; VAIPOULOS, G.; KITTAS, C. PANGALIS, G.A . Prognostic factors in advanced stage Hodgkin's disease : The significance of the number of involved anatomic sites. **Eur J Haematol**, v. 67, n. 5-6, p. 279-288, 2001.

VON WASIELEWSKI, R; MENGEL, M.; FISCHER, R.; HANSMANN, M.L.; HÜBNER, K.; FRANKLIN, J.; TESCH, H.; PAULUS, U.; WERNER, M.; DIEHL, V.; GEORGII, A. Classical Hodgkin's disease: Clinical Impact of the Immunophenotype. **American Journal of Patology**, v. 151, n. 4, p. 1123-1130, 1997.

YOUNES A. Are activated cytotoxic T cells in Hodgkin's disease biopsies a poor prognostic marker? **Blood**, v. 90, n. 2, p. 890-1, Jul, 1997.

WATANABE, K.; YAMASHITA, Y.; NAKAYAMA, A.; HASEGAWA, Y.; KOJIMA, H.; NAGASAWA, T.; MORI, N. Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed—Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. **Histopathology**, v. 36, n. 4, p. 353 –361, 2000.

WEIHRAUCH, M.R.; MANZKE, O .; BEVER, M., HAVERKAMP, H.; DIEHL, V.; BOHLEN, H.; WOLF, J.; SCHULTZE, J.L. Elevated serum levels of CC thymus and activation-related chemokine (TARC) in primary Hodgkin's disease: potential for a prognostic. **Cancer Res**, v. 65, n. 13, p. 5516-5519, 2005.

WIELAND, A.; KERBL, R.; BERGHOLD, A.; SCHWINGER, W.; MANN, G.; URBA, C. C-reactive protein (CRP) as tumor marker in pediatric and adolescent patients with Hodgkin's disease. **Med Pediatr Oncol**, v. 41, n. 1, p. 21-25, 2003.

WIJLHUIZEN, T.J.; VRINTS, L.W.; JAIRAM, R.; BREED, W.P.; WIJNEN, J.T.; BOSCH, L.J.; CROMMELIN, M.A.; VAN DAM, F.E.; DE KONING, J.; VERHAGEN-TEULINGS, M. Grades of nodular sclerosis (NSI-NSII) in Hodgkin's disease. Are they of independent prognostic value? **Cancer**, v. 63, n. 6, p. 1150-1153, 1989.

WRIGHT, C.F.; REID, A.H.; TSAI, M.M.; VENTRE, K.M.; MURARI, P.J.; FRIZZERA, G.; O'LEARY, T.J. Detection of Epstein-Barr virus sequences in Hodgkin's disease by the polymerase chain reaction. **Am J Pathol**, v. 139, n. 2, p. 393-398, 1991.

ZOU, X.G.; SANDVEJ, K.; LI, P.J.; JI, X.L.; YAN, Q.H.; ZHANG, X.P.; DA, J.P.; DUTOIT, S.J.H. Epstein-Barr Virus (EBV) in Chinese Pediatric Hodgkin Disease. **Cancer**, v. 92, n. 6, p. 1621-1631, 2001.

Apêndices

APÊNDICE I: BLOCOS COM LAUDO DE LINFOMA DE HODGKIN

Origem:

Prontuário:

Registro:

Data:

Nome:

Idade:

Local da biopsia:

Dados clínicos:

Laudo Histopatológico:

Imunohistoquímica:

Origem:

Prontuário:

Registro:

Data:

Nome:

Idade:

Local da biopsia:

Dados clínicos:

Laudo Histopatológico:

Imunohistoquímica:

Origem:

Prontuário:

Registro:

Data:

Nome:

Idade:

Local da biopsia:

Dados clínicos:

Laudo Histopatológico:

Imunohistoquímica:

APÊNDICE II: FICHA CLÍNICA LABORATORIAL

1) IDENTIFICAÇÃO

No. do paciente

1.2 Número do prontuário: _____ Número da biopsia: _____

1.3 Instituição: _____

1.4 Procedência: _____

2) INFORMAÇÃO DEMOGRÁFICA

2.1 Data do Nascimento: ___/___/___ Idade ao diagnóstico: _____

2.2 Sexo: Masculino () Feminino ()

3) INFORMAÇÃO DIAGNÓSTICA

3.1 Tempo de doença: _____ Ignorado () Recidiva: Sim () Não ()

3.2 Peso: _____Kg Estatura: _____cm SC: _____m²

3.3 Localização da doença:

Linfonodos: Quantos: 1 () 2 a 3 () > 3 ()

Quais: Cervical () Supra clavicular () Axilar ()

Mediastinal () Abdominal () Inguinal ()

Órgãos: Sim () Não ()

Quais: Baço () Fígado () Medula óssea ()

Outros: _____

3.4 Sintomas: Sim () Não () Ignorado ()

Quais: Febre () Sudorese () Perda de peso ()

Outros: _____

3.5 Hb = _____ Leucócitos = _____ Linfócitos = _____ VHS = _____ LDH = _____

3.6 Biopsia óssea: Sim () Não ()

Medula óssea infiltrada: Sim () Não ()

3.7 Estadiamento Ann Arbor:

IA () IIA () IIIA () IVA ()

IB () IIB () IIIB () IVB ()

4) CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA:

4.1 Morfologia:

Linfoma de Hodgkin clássico: EN () CM () DL () NC ()

Linfoma de Hodgkin com predominância linfocítica nodular ()

4.2 Imunohistoquímica: p = positivo n = negativo

CD15 () CD 20 () CD30 () CD45 () EMA () Frutalina Biotilada ()

Observações: _____

5) RESPOSTA AO TRATAMENTO: RF () RD () NA ()

Resposta favorável (RF) = Remissão completa

Não avaliada (NA) = Abandono

Resposta desfavorável (RD) = remissão parcial, não resposta ou progressão de doença

APÊNDICE III

TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS

Eu, _____, pesquisador (a) do projeto ***Utilização de frutalina, uma lectina α D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L, nos Linfomas de Hodgkin***, garanto a manutenção da privacidade e da confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato dos pacientes quando da divulgação dos resultados. Os dados obtidos somente poderão ser utilizados para o projeto ao qual se vinculam. Todo e qualquer outro uso que venha a ser planejado deverá ser objeto de novo projeto de pesquisa, que deverá ser submetido à apreciação da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde.

Anexos
