

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
FACULDADE DE MEDICINA**

MARÍLIA TAUMATURGO PINTO

**ESTUDO COMPARATIVO DA ASSOCIAÇÃO DO VÍRUS DE EPSTEIN-
BARR COM O LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO EM ADULTO.
ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO E POR HIBRIDIZAÇÃO IN SITU
DE CASOS DO CEARÁ (BRASIL) E DE DIFERENTES REGIÕES DA
FRANÇA**

**FORTALEZA
2003**

MARÍLIA TAUMATURGO PINTO

**ESTUDO COMPARATIVO DA ASSOCIAÇÃO DO VIRUS DE EPSTEIN-
BARR COM O LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO EM ADULTO. ESTUDO
IMUNOHISTOQUIMICO E POR HIBRIDIZAÇÃO IN SITU DE CASOS DO
CEARÁ (BRASIL) E DE DIFERENTES REGIÕES DA FRANÇA**

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 em Patologia. Orientador: Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho

FORTALEZA

2003

P729e Pinto, Marília Taumaturgo

Estudo comparativo da associação do vírus de epstein-barr com o linfoma de hodgkin clássico em adulto. estudo imunohistoquímico e por hibridização in situ de casos do Ceará (Brasil) e de diferentes regiões da França / Marília Taumaturgo Pinto. - Fortaleza, 2003.

80 f.

Orientadora: Prof.^o Dr. Francisco Dário Rocha Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Patologia.

1. Doença de Hodgkin 2. Herpesvirus humano 4 I. Rocha Filho, Francisco Dário (orient.) II. Título.

CDD: 616.99446

MARILIA TAUMATURGO PINTO

**ESTUDO COMPARATIVO DA ASSOCIAÇÃO DO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR
COM O LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO EM ADULTO. ESTUDO
IMUNOHISTOQUIMICO E POR HIBRIDIZAÇÃO IN SITU DE CASOS DO CEARÁ
(BRASIL) E DIFERENTES REGIÕES FRANÇA**

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

Aprovada em 07/11/2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Venâncio Avancine Ferreira Alves
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira.
Universidade Federal do Ceará

**Aos meus pais Olavo e Nuncy (*in memoriam*) que
precoceamente foram privados do convívio familiar e a
Deus por dar-me forças para suportar tão imensa dor,
dedico este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Deus pelo dom da vida e por manter-me saudável física e psicologicamente para desenvolver todas as minhas atividades.

Aos meus professores e orientadores Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho e Francisco Valdeci de Almeida Ferreira que tudo fizeram para transmitir o máximo de conhecimentos profissionais, mostrando alto grau de conhecimento e compreensão num momento muito difícil de minha vida sem deixar-me perder o entusiasmo pela conclusão do trabalho.

Ao Prof. Dr. Geraldo de Souza Tomé que introduziu-me no campo da Patologia.

As Médicas Patologistas Denise Nunes de Oliveira e Déborah Nunes que desde cedo apresentam participação marcante em todos os momentos pessoais e profissionais da minha vida.

Ao meu marido Emerson, que juntamente comigo no decorrer do meu curso dividiu momentos delicados e por que não dizer, difíceis, de nossas vidas. Obrigada pela compreensão e incentivo.

Aos meus filhos Isaac e Gabriel que sem direito de escolha passaram muito tempo sem o convívio do pai e por vezes também sem a atenção devida da mãe. Em breve entenderão o valor dos sacrifícios e as dificuldades da vida.

Aos meus irmãos Maurício, Eneida, Rita, Magali e a Lourdes, que sempre foram companheiros em todos os momentos e cujo laço afetivo mantém-se íntegro independente das perdas.

Aos cunhados Nerilson, Jesus e Luíza que sempre agiram como verdadeiros irmãos em todos os momentos.

A minha mãe que embora distante, em seu leito eterno continua orientando-me através de seus ensinamentos. Com certeza me assiste e me acompanha em todos os momentos de minha vida.

Ao meu pai; exemplo de integridade, trabalho, imenso conhecedor do Direito e a maior fonte de cultura geral por mim já visto. Uma vida dedicada a defender a igualdade de direitos independente da condição social. Ensinou-me desde cedo valores como caráter, responsabilidade e humildade. A sociedade perdeu um grande homem. Obrigada por tudo.

A minha sogra Raimundinha pela constante disposição em ajudar-me com meus filhos em momentos importantes quando fazia-se necessário concentração e tranquilidade para escrever. Obrigada.

As colegas de mestrado Alessandra, Fernanda e Lourdes, pelo companheirismo e amizade dentro e fora da instituição.

A amiga e colega de mestrado Luciana Rocha que tornou as horas de estudo momentos de grande prazer pela graça de sua companhia e divisão de seus conhecimentos em Patologia. Aprendi muito com você.

A amiga Simone pela amizade e apoio a mim dispensados. Posso afirmar que sei o que é uma amiga para todas as horas.

À senhora Paula da Paz Palácio, secretária do Mestrado em Patologia pela presteza apresentada.

À Eliane Souto de Abreu e Lindomagno Pessoa Leite cujos trabalhos foram de muita valia na realização desta dissertação.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina (UFC) na pessoa de sua diretora, Norma de Carvalho Linhares, que sempre com muita simpatia auxiliaram-me na revisão de literatura.

As funcionárias da Biblioteca do Hospital do Câncer do Ceará, na pessoa das senhoras Sálemma Maria Lima Sugette e Jucileide Rodrigues de Andrade pela presteza, paciência e simpatia a mim dispensadas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal, especialmente a senhora Margareth Gonçalves Maia e senhor Francisco José Oliveira de Queiróz pela valiosa contribuição na realização do experimento desta pesquisa.

Ao professor Dr. Talapala Govindaswamy Naidu pelas valiosas correções feitas no artigo para publicar.

A Dra. Silvia Magalhães pela atenção, tempo dispensado e sugestões no artigo a ser publicado.

A CAPES e CNPq pelo oportuno apoio financeiro que possibilitou a minha dedicação de forma mais integral ao Mestrado.

“Sábio é o homem que conhece alguma coisa sobre tudo; e tudo sobre alguma coisa. O mais sábio é aquele que estuda como se fosse viver eternamente, e vive como se fosse morrer amanhã.”

RESUMO

A associação do Linfoma de Hodgkin Clássico (LHc) com o vírus de Epstein-Barr (EBV) tem sido observada em vários países de diferentes condições sócio - econômicas. Recentemente usando-se técnica de Imunohistoquímica (IHQ) e Hibridização *in situ* (HIS) porções virais foi encontrada exclusivamente nas células características do Linfoma de Hodgkin que são as chamadas células de Reed-Sternberg (RS) e suas variantes chamadas células Hodgkin (H). Empregando estas técnicas nosso trabalho foi realizado de modo a fazer uma análise comparativa de uma amostra de 118 casos de origem do Ceará - Nordeste do Brasil e de diferentes regiões da França, sendo todos os pacientes de faixa etária entre 18 e 64 anos de idade. Com o propósito de convencionar parâmetros para análise comparativa e interpretação de resultados buscou-se alguns trabalhos de pesquisadores cujo objetivo maior era de avaliar o percentual dessa associação nos respectivos países onde observou-se uma escassez de trabalhos comparando dois ou mais países. A prevalência do EBV em lesões nodais de 37 pacientes do nordeste brasileiro com Linfoma de Hodgkin clássico foi comparada com 33 pacientes franceses. Houve predominância em pacientes brasileiros do sexo feminino (51,3%) e em pacientes franceses do sexo masculino (65,3%) sendo a média de idade similar em ambos os grupos (34,8 anos). Dos subtipos histológicos a Esclerose Nodular (EN) esteve presente em 23 casos brasileiros e em 29 franceses e Celularidade Mista (CM) em 11 brasileiros e 4 franceses. Depleção Linfocitária (DL) e não classificados foram raros. O LMP1 (Proteína de Membrana Latente) foi expresso nas células RS em 25 (67,5%) dos casos brasileiros e em 10 (30,3%) dos franceses e o Epstein-Barr encoded RNA (EBER) foi evidente em 75,6% de Brasil e 30,3% da França. A relação entre subtipo histológico e detecção viral foi mais freqüente no subtipo Celularidade Mista. Deduz-se com esses resultados que o EBV tenha uma maior participação na patogênese do LH Clássico nos casos do Ceará que em pacientes oriundos da França.

Palavras - Chave: Linfoma de Hodgkin Clássico, Vírus Epstein-Barr, imunohistoquímica, hibridização *in situ*

ABSTRACT

The prevalence of Epstein-Barr virus (EBV) detection in nodal lesions of 37 northeastern Brazilian patients (BR) with classical Hodgkin's lymphoma (CHL) was compared to that of 33 French patients (FR). Seventy of 118 CHL cases were evaluated for the EBV presence by immunohistochemistry using latent membrane protein (LMP-1) antibody and by *in situ* hybridization method for Epstein-Barr virus latency associated RNA (EBER). The disease was predominant in Brazilian females (51.3%), and in French males (65.3%) and the median age of patients was similar in both groups (34.8 y). Of the histological subtypes, nodular sclerosis (NS) was present in 23 BR and in 29 FR and mixed cellularity (MC) in 11 BR and 04 FR. Lymphocytic depletion (LD) and unclassified lesions (UL) were very few. LMP-1 was expressed in Reed Sternberg cells in 25 (67, 5%) BR and in 10 (30, 3%) FR; and the EBER was evident in 75, 6% of BR and in 30.3% of FR. The relation between histological type and viral detection was more frequent in MC subtype. These findings suggest that the association between EBV and CHL in northeastern Brazilian cases is stronger than in French patients.

Keywords: Classical Hodgkin's lymphoma; Epstein-Barr virus; immunohistochemistry; *in situ* hybridization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	PÁG.
FIGURA 1 Thomas Hodgkin.....	16
FIGURA 2 Célula de Reed-Sternberg	20
FIGURA 3 Linfoma de Hodgkin subtipo Celularidade Mista. Aumento 200xHE...	76
FIGURA 4 Linfoma de Hodgkin subtipo Esclerose Nodular. CD 30 +.....	76
FIGURA 5 Linfoma de Hodgkin: subtipo Esclerose Nodular. EBER+	77
FIGURA 6 Linfoma de Hodgkin subtipo Esclerose Nodular. LMP 1 +.....	77
QUADRO 1 Estágios dos Linfomas. Classificação de Ann Arbor.....	19
QUADRO 2 Tipo/ relação do EBV- LHC. Ce, RJ, SP e França.....	51
GRÁFICO 1 Comparação das Classificações REAL e Rye.....	22
GRÁFICO 2 Modelo de bimodalidade do Linfoma de Hodgkin (MacMahon).....	31

LISTA DE TABELAS

		Pág.
TABELA 1	Expressão de CD15 e CD30 em Linfoma de Hodgkin Clássico.....	25
TABELA 2	Dados Morfológicos e Clínicos de Linfoma de Hodgkin Clássico.....	49
TABELA 3	Expressão de CD15,CD30 e do EBV(LMP1 e EBER no Brasil e França).....	50
TABELA 4	Resultado da IHQ e HIS de acordo com subtipo histológico e localização geográfica.....	50

LISTA DE SIGLAS

ABC:	Complexo avidina-biotina-peroxidase
CD:	Cluster of designation
CNF:	Carcinoma nasofaríngeo
DAB:	Diaminobenzidina.
LHc:	Linfoma de Hodgkin clássico
LHCM:	Linfoma de Hodgkin, subtipo Celularidade Mista.
LHCRL:	Linfoma de Hodgkin Clássico Rico em Linfócito.
LHDL:	Linfoma de Hodgkin, subtipo Depleção Linfocitária
LHEN:	Linfoma de Hodgkin, subtipo Esclerose Nodular
LHPL:	Linfoma de Hodgkin, subtipo Predominância Linfocitária.
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
EBER:	Epstein- Barr encoded RNA.
EBNA:	Epstein-Barr nuclear antigen.
EBV:	Epstein-Barr vírus.
EUA:	Estados Unidos da América.
HE:	Hematoxilina-Eosina.
HIS:	Hibridização in situ
Ig:	Imunoglobulina
IHQ:	Imunohistoquímica
IL:	Interleucina
LMP-1:	Latent membran protein
MI:	Mononucleose Infecciosa
OMS:	Organização Mundial de Saúde.
PCR:	Polimerase chain reaction
REAL:	Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasma

SUMÁRIO

		Pág.
1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	O Linfoma de Hodgkin (LH).....	16
1.2	O vírus Epstein- Barr (EBV).....	26
1.3	Associação do EBV com LH.....	30
1.4	EBV e outras patologias associadas.....	33
1.4.1	Carcinoma nasofaríngeo (CNF).....	33
1.4.2	Mononucleose Infecciosa (MI).....	34
1.4.3	Linfoma de Burkitt (LB).....	34
1.4.4	Outras neoplasias.....	35
1.5	Associação do LH com o EBV considerando sua distribuição no Brasil e no Mundo.....	35
1.6	Importância da Pesquisa.....	41
2	OBJETIVOS.....	43
2.1	Objetivo Geral.....	43
2.2	Objetivos Específicos.....	43
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1	Material.....	44
3.2	Metodologia.....	44
3.2.1	Estudo morfológico.....	44
3.2.2	Estudo Imunohistoquímico.....	45
3.2.3	Controles da técnica de Imunohistoquímica.....	46
3.2.3.1	Técnica de Imunohistoquímica.....	46
3.2.4	Estudo por Hibridização in situ (HIS).....	46
3.2.5	Técnica de hibridização in situ.....	46
3.2.6	Interpretação dos resultados das reações de IHQ e HIS.....	46
4	RESULTADOS	48
5	DISCUSSAO.....	52
6	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	66
	ANEXOS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Linfoma de Hodgkin (LH)

a) Considerações Gerais:

Descrita pela primeira vez em 1832 pelo médico inglês Thomas Hodgkin (Figura 01), que a descreveu como uma doença única que acometia o sistema linfático, sendo assim criada uma nova doença que viria a ser conhecida pelo seu nome alguns anos depois, precisamente em 1865, quando Samuel Wilks a designou como Doença de Hodgkin, reconhecendo a importância dessa patologia (BURKE, 1992)

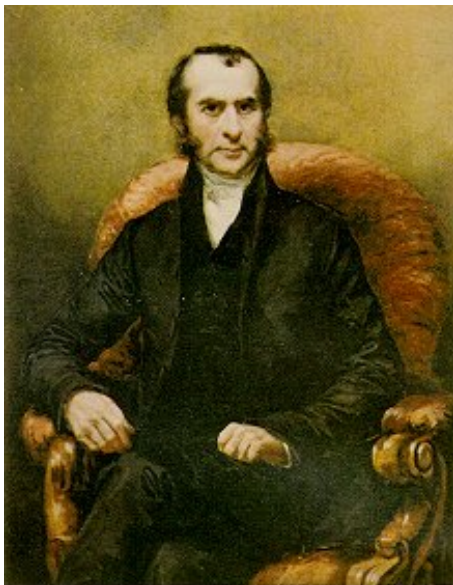


Fig. 01- Sir Thomas Hodgkin (1798-1866), médico inglês e primeiro a descrever o Linfoma de Hodgkin.

Fonte: Cancer Research, v 26, capa 1966

Em 1872, Langhans fez a primeira descrição microscópica da doença.

Em 1898 e em 1902 o patologista austríaco Carl Sternberg e a médica americana Dorothy Reed, respectivamente, descreveram a célula característica do Linfoma de Hodgkin (BURKE, 1992; POMPEMA, 1992) a então denominada célula de Reed-Sternberg (RS) que apresenta características neoplásicas com evidências de origem linfóide B, sendo o termo Linfoma de Hodgkin preferível à Doença de Hodgkin (JAFFE; HARRIS; STEIN, et al, 2001). Estas células representam uma fração mínima de 1 a 2% da massa tumoral total (BANKS, 1995; SUDEN et al;1987) e juntamente com suas formas variantes, chamadas de

células Hodgkin (CH), associadas a fundo celular característico constituído de células inflamatórias não - neoplásicas e células acessórias, são necessárias ao diagnóstico da doença.

Cerca de 90% dos casos da doença primeiro se manifesta em linfonodos, sendo aproximadamente 75% na região cervical, 15% na região axilar e 10% em região inguinal (ULTMANN; MORAN, 1973). A disseminação hematogênica e invasão vascular são eventos raros assim como a manifestação extranodal que é quase restrita aos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). (BURKE, 1992; HERNDIER, et al., 1994; BACCHI, et al., 1996). Esses pacientes tendem a apresentar estágios avançados da doença (SCHOEPPPEL; HOPPE RT; DORFMAN, et al, 1985).

A presença de sintomas B em alguns pacientes forma um quadro constituído por febre superior a 38°C por três dias consecutivos, sudorese noturna e perda de peso correspondente a aproximadamente 10% do peso corporal nos últimos seis meses (LISTER; CROWTHER; SUTELIFFE, et al, 1989). A etiologia desses sintomas permanece inexplicada, apesar dos esforços para elucidá-lo, sendo a sua constatação importante para caracterizar um prognóstico menos favorável. A febre está presente em aproximadamente 27% dos pacientes no momento do diagnóstico (BANKS, 1995).

A classificação da evolução da doença levando em consideração o seu estadiamento foi descrita por Ann Harbor, com modificação de Cotswolds, conforme o Quadro1. A importância do estadiamento refere-se principalmente ao prognóstico como também na orientação do esquema terapêutico.

Jandl, 1996 descreve um quadro mais grave de LH caracterizado por obstrução da veia cava superior ou compressão súbita da medula espinhal, assim como presença de sintomas diversos, como prurido generalizado, acompanhado de escoriações que raramente acontecem na ausência de febre ou sudorese noturna que podem se manifestar sem alteração do prognóstico. Aproximadamente 10% dos pacientes com LH referem dor nos linfonodos comprometidos após a ingestão de álcool sem valor prognóstico.

Intensa investigação em busca da origem da célula RS tem sido feita. Inicialmente, postulou-se que pudessem ser o resultado da fusão entre linfócitos e células reticulares (Warner Apud Haluska, 1994) ou mesmo entre linfócitos (SINKOVICS apud HALUSKA, 1994). Posteriormente tais células tiveram sua origem relacionada a diferentes tipos celulares, como macrófagos ou histiócitos, células reticulares interdigitantes, dendríticas ou granulócitos (HALUSKA, et al: 1994; SAID, 1992). Evidências de origem de células B são o relato da produção de antígenos específicos de linfócitos B como a cadeia J (POPPEMA, 1992) e a tendência do LHPL variante nodular em progredir para LNH B difuso de grandes células em até 10% dos casos (MENESTRINA, et al,1995). A infecção de células RS pelo EBV reforça a teoria de origem B (HERNDIER, et al., 1994) Pesquisas mais recentes baseadas em técnicas de imunofenotipagem e biologia molecular, apoiam a tese de sua origem linfóide B (WEISS, et al., 1987; SUNDEN, 1987; WRIGHT, et al.1994.; HALUSKA, 1994; HUMMEL, et al., 1995; STEIN, 1997). Bräuninger et al,1999 em seu trabalho sobre identificação da célula precursora dos linfomas, onde é feito um estudo de dois casos de pacientes com linfoma composto através de tecidos congelados e micromanipulados, concluíram ser a célula RS de origem provável em célula B do centro germinativo. Mostraram ainda através de estudos moleculares das células RS 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.

QUADRO 1 – Estágios clínicos dos Linfomas Hodgkin e não-Hodgkin (Classificação de Ann Arbor modificada por Cotswolds)

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.

* Todos os estágios são ainda subdivididos na ausência (A) ou presença (B) dos sintomas B.

Fonte: DE CARBONE, P. T. et. al. Sympósium (Ann Arbor): Staging in Hodgkin's disease. Câncer Res. 31:1707, 1971 (ROBBINS: 2000, p.570).

b) Estudo Morfológico

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 frequentemente parecendo imagens especulares, geralmente apresentam acentuada acidofilia, anfofilia 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 a cromatina ausente em volta do nucléolo formando um halo perinucleolar.



Fig.2. Célula em “olho de coruja”

As células Hodgkin ou variantes da célula de Reed - Sternberg incluem as mononucleares, a multilobada com núcleos polipóides semelhantes a pipoca ("pop-corn"), própria do subtipo Predominância Linfocítica 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.

A célula RS é evidenciada em todos os tipos histológicos da doença e atua como um fator diferenciador do Linfoma de Hodgkin para os outros tipos de linfoma, onde no primeiro aparece associada a fundo celular característico. De tal forma, sua identificação é essencial para o diagnóstico histológico da doença associado a contexto clínico compatível. Células RS-like podem ser encontradas em algumas condições infecciosas e nas adenopatias reacionais (ABREU, 1996) como a mononucleose infecciosa (ADDIS & ISAACSON, 1986; BURKE, 1992) e neoplásicas tais como linfomas T, linfoma B rico em célula T, linfomas anaplásicos, micose fungóide e nas adenopatias reacionais. (ABREU, 1996).

Célula de morfologia semelhante a RS foram também identificadas em linfonodos de pacientes apresentando Leishmaniose visceral e tuberculose (FERREIRA & MENEZES, 1977). Dessa forma, para a confirmação do diagnóstico do LH a célula RS deve ser considerada relacionada com o infiltrado celular não neoplásico, como linfócitos maduros, plasmócitos, histiócitos, eosinófilos e polimorfonucleares, além da relativamente freqüente presença de necrose.

Em virtude de haver diferenças histológicas e relacionadas ao prognóstico, Jackson e Parker em 1947 propuseram a primeira classificação para o Linfoma de Hodgkin onde distinguia-se três subtipos assim classificados: sarcoma, paragranuloma e granuloma, sendo este último mais freqüente.

Em 1966, Lukes, Butler e Hicks propuseram uma nova classificação para os linfomas incluindo as formas Linfocítica e Histiocítica (LH) nodular e difusa, Esclerose Nodular, Celularidade Mista e Fibrose difusa e reticular (BURKE, 1992; POPPEMA, 1992).

Em 1993, Lukes et al. *Apud* Eyre, a partir de um simpósio internacional ocorrido na cidade de Rye, em Nova Iorque surgiram uma classificação mais simplificada dos grupos de Lukes e Butler onde foram criados os quatro grupos histológicos a seguir: Predominância Linfocítica (DHPL) abrangendo as formas linfocítica e histiocítica nodular e difusa, Celularidade Mista (DHCM), Esclerose Nodular (DHEN) e Depleção Linfocitária (DHDL), envolvendo as antigas variantes reticular e difusa.

Em 1994, o "International Lymphoma Study Group " publicou a classificação REAL (Revised European- American Classification of Lymphoid Neoplasma) e pela primeira vez incluiu-se o LH juntamente com o Linfoma não- Hodgkin (LNH) com distinção de dois grupos : Forma não Clássica (Predominância Linfocítica Nodular) e a forma Clássica. Em relação a classificação de Rye, apresenta a adição de uma nova categoria que é a forma Clássica rica em linfócitos (LHCRL). (CHAN, 2001).

O Linfoma de Hodgkin Clássico inclui as variedades Esclerose Nodular (EN) e Celularidade Mista (CM), Depleção Linfocitária DL) e forma clássica rica em linfócitos (FCRL) mostrando grandes células neoplásticas com típico imunofenótipo de células RS representados da seguinte forma: (CD 30 +, CD 15 +, CD20 -/+). (CHAN, 2002) Os linfócitos de fundo são policlonais e predominantemente de imunofenótipo T além de ocasional positividade para vimentina interpretada como indicador de crescimento neoplásico ou a integração do EBV com expressão de LMP-1(*latent membrane protein*) (ABREU, 1996).

Uma nova classificação para os tumores linfóides foi recentemente elaborada sendo um projeto da Sociedade de Hematopatologia e Associação Européia de

Hematopatologistas sob o patrocínio da Organização Mundial de Saúde (OMS). Relacionado ao Linfoma de Hodgkin não há nenhuma mudança significativa da classificação REAL, exceto pelo fato do Linfoma de Hodgkin Clássico Rico em Linfócito (LHcRL) ser considerado uma categoria definitiva em vez de entidade provisória como classificado anteriormente. No passado casos de LHcRL foram frequentemente diagnosticados como LHPL, sendo outros como dos tipos celularidade mista e esclerose nodular. Hoje, evidências indicam que existem diferenças moleculares entre LHPLN e LHc (CHAN, 2001).

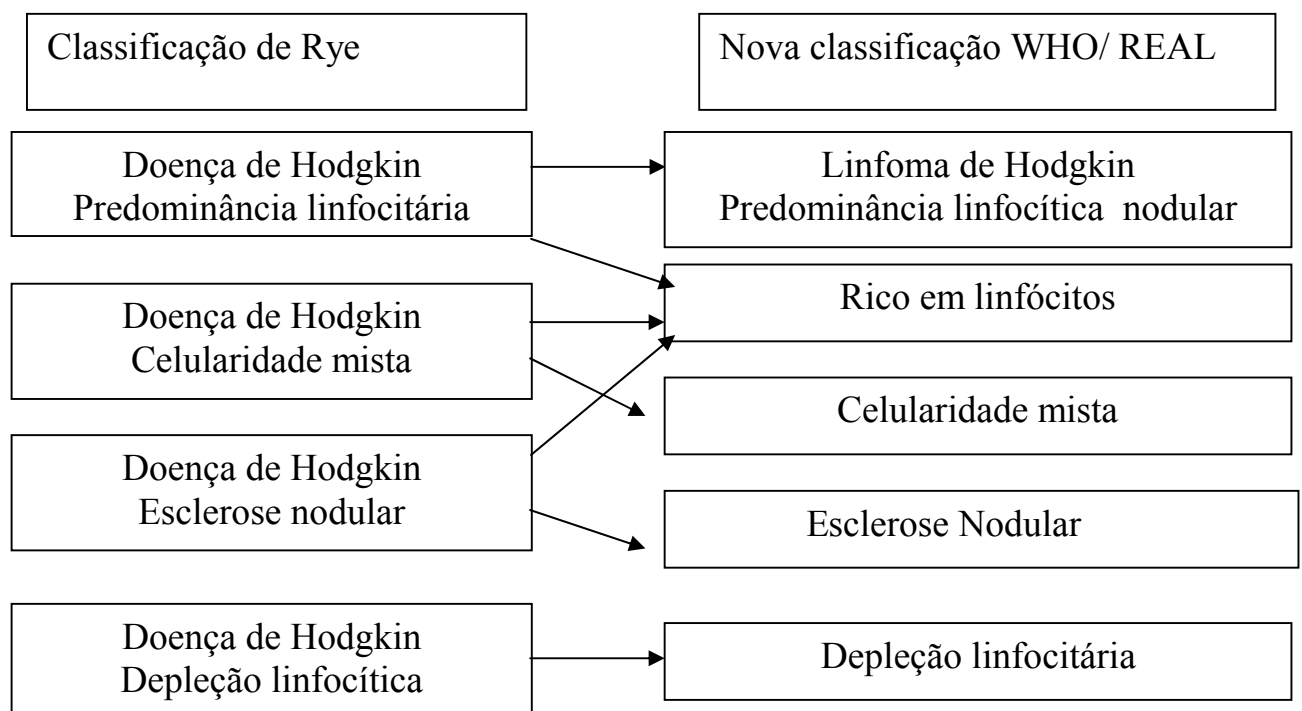


Gráfico 1: Comparação das Classificações REAL e Rye

FONTE: *Hematol Oncol*: 2001; 19:129-150.

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, envolvendo linfonodos cervicais, supraclaviculares e mediastinais, com excelente prognóstico. 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 presente , assim como as chamadas "células múmias" (degeneradas ou mortas) (BURKE, 1992; FERRY, et al., 1993). Alguns pacientes apresentam-se no estágio II da doença e os sintomas B são vistos em aproximadamente 40% dos casos.

O subtipo Celularidade Mista (LHCM) está freqüentemente mais associado a sintomas B. Estudos mostraram que é o subtipo predominante em regiões subdesenvolvidas (CHANG et al., 1993; GAD - EL- MAWLA, et al., 1983; 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 (E.U.A.) e sendo mais comum em homens. Estudos feitos por Abreu, et al., (1996) demonstraram que em crianças e adolescentes no estado do Ceará, a forma CM 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 embora possa ser evidenciado padrão de crescimento interfolicular. Fibrose intersticial pode estar presente, não sendo vistas bandas largas de colágeno como no tipo Esclerose Nodular. Nesse tipo os sintomas B são freqüentes e a doença pode se expressar nos estágios III ou IV.

Linfoma de Hodgkin Clássico Rico em Linfócitos é um subtipo, caracterizado por escassas células RS espalhadas ou em nódulos, associado a fundo celular difuso mostrando uma abundância de pequenos linfócitos, ausência dos tipos celulares neutrófilos e eosinófilos e de bandas de colágeno como aquelas encontradas no subtipo Esclerose Nodular (HARRIS, et al. 1994; ANAGNOSTOPOULOS, et al. 2000; ASLRTON-KEY, et al.1995; LUKES; BUTTLER, 1966).

O Linfoma de Hodgkin do tipo Depleção Linfocitária ocorre em aproximadamente 5% dos casos apresentando as subcategorias (BARGU, et al.1997) fibrose difusa e reticular, ambas de ocorrência rara, sendo que na primeira ocorre perda da arquitetura e a cápsula permanece intacta. A incidência tem diminuído nos últimos anos com alguns estudos mostrando casos antes descritos como LHDL sendo agora reclassificados como Linfoma Não-Hodgkin (KANT, et al. 1986). A média de idade é semelhante aos outros LHC, sendo de aproximadamente 37 anos com 75 % dos pacientes sendo do sexo masculino. Esse subtipo

está muito associado com infecção pelo HIV. Aproximadamente 70% estão associados com estágios avançados e 80% com sintomas B (NEIMAN; ROSEN; LUKES, 1973).

b) Fenótipo

Segundo Stein *Apud* Haluska, 1994, 85% dos casos de DHCM e DHEN expressam o antígeno Ki-1 (CD 30). Este antígeno reconhece uma proteína associada a ativação que é um membro do fator de necrose tumoral/ superfamília de receptores de fator de crescimento neural. Sua coloração pode ser membranar ou paranuclear ou ambas. O CD 30 é positivo nas células de Reed Sternberg em aproximadamente 90% dos casos de Linfoma de Hodgkin Clássico (SCHMID C, PAN L, DISS T, et al, 1991; ENBLAD G, SUNDSTRON C, GLIMERLIUS B, 1993; HALL P.A., D'ARDENNE A. J. STANSFELD A.G., 1988). É expresso primariamente em linfócitos podendo ser encontrado ocasionalmente em macrófagos. O CD 30 pode ser encontrado também em linfomas não-Hodgkin de células T: linfadenopatia angioimunoblástica, papulose linfomatóide e o Linfoma Anaplásico de Grandes Células (LAGC) (LEITE, LP: 1998).

O grupo de anticorpos Leu-M1 (CD 15) reage contra um X hapteno presente em neutrófilos maduros, alguns monócitos e um grupo de células T (ARBER, et al, 1993). Banks (1995) descreve sua reatividade também para linfócitos T ativados, células infectadas por citomegalovírus que podem ser confundidas com células Hodgkin, e células não pertencentes à linhagem linfóide. Sua coloração pode ser membranar, paranuclear, citoplasmática ou em alguns casos uma combinação de ambos. A reatividade ao CD15 não está limitada a células hematolinfóides sendo que uma ampla variedade de tumores epiteliais podem ser CD15 positiva, particularmente os adenocarcinomas (acima de 60%) (SHEIBANIK, et al, 1996). O Linfoma de Hodgkin Clássico (LHc) apresenta uma positividade alta das células RS para o CD 15 (de 82 a 89%) (Tabela 1) (ARBER; WEISS, 1993; AGNARSONB; KADIN, 1989; ENBLAD, et al. 1993; CHITTAL, et al. 1988; HALL; D'ARDENE; STANSFELD, 1988; MEDEIROS, et al. 1988; PINKUS, et al. 1985; REE, et al. 1989). Em contraste menos de 10% dos casos de Linfoma de Hodgkin Predominância Nodular (Não Clássico) expressam CD 15 (ARBER; WEISS, 1993).

Alguns autores dentre eles Haluska, et al (1994) relataram que em mais de 40% dos casos de LH na forma clássica observa-se positividade para os antígenos pan-T CD2(LFA-2) e CD3 (PICKER; BRENNER; MICHIE, 1988) ou CD4, antígeno presente em células T helper. Vários outros antígenos, apesar de inespecíficos para LH também podem ser expressos pela célula RS como o receptor para interleucina 2 (IL-2) (CD 25), do OKT9 (CD71 - receptor para transferrina), do Ki-67(marcador de proliferação celular).

A forma não - clássica do LH distingue-se da forma clássica pela expressão homogênea do antígeno pan-B (CD20) inclusive com rearranjo de Ig demonstrado pela biologia molecular. Habitualmente expressa outros antígenos como o Antígeno Leucocitário Comum (CD 45) e o Antígeno Epitelial de Membrana (EMA).(ARBER et al, 1993; BEARMAN et al, 1978;BORING et al, 1993;CHANG et al,1993). Em contraste com as células de Hodgkin as células L&H são positivas para Antígeno Leucocitário Comum (LCA-CD 45). Raramente expressam marcadores de linhagem T (CHU et al, 2000). Alguns trabalhos mencionam positividade para os antígenos CD30 ou CD15 (ARBER et al, 1993; GROGAN et al,1982; CHU et al, 2000).

Tabela 01 - Expressão de CD15 e CD30 em Linfoma de Hodgkin Clássico (LHc)

Subtipos de LHc	Positivo/Total de casos/Percentual	
	CD15*	CD 30+
LHEN	501/566(89%)	318/361(88%)
LHCM	330/387(85%)	257/281(91%)
LHDL	60/68(82%)	27/31(87%)
Outros	37/47(82%)	40/45(89%)

*Dado de referência :ARBER DA,WEISS L: CD 15: A review. Appl Immunohistochem 1:17-30,1993.

+Dado de referência: CHANG KL,ARBER DA,WEISS LM:CD30:A review. Appl Immunohistochem 1:244-255,1993.

Linfoma de Hodgkin Clássico está associada com hiperexpressão e padrão anormal de citocinas e quimiocinas e/ou seus receptores em células RS. Essas células podem expressar uma variedade de citocinas e quimiocinas incluindo interleucinas-2 (IL-2), IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13 e receptor de IL-13, fator estimulador de colônia de granulócitos-

macrófagos , lymphotoxina-a, fator β de crescimento de transformação (TGF- β), eotaxina e quimiocina TARC. A expressão de quimiocinas e citocinas anormais provavelmente explica abundante mistura de células inflamatórias presentes.

Cabanallis *apud* Banks, 1995 identificou o mais comum " ponto de quebra" (11q23,14q32,6q11-21 e 8q22-24), semelhantes aos observados em outros linfomas, reforçando a hipótese da origem linfóide para o LH citando também a presença de translocação t(14;18) (q32,q21), típica dos linfomas foliculares de células B. Contran, 1994,descreve esta translocação como responsável pelo hiperexpressão de *bcl-2* (oncogene responsável pela inibição da apoptose celular). Alguns estudos indicam a alta incidência de anormalidades estruturais envolvendo regiões cromossomais 12p11-13, 13p11-13, 3q68-28, 6q15-16 e 7q31-35 (TILY; BASTARD; DELASTRE, et al., 1991).

1.2 O vírus Epstein- Barr (EBV)

O EBV foi o primeiro dos Herpesvírus a ser descoberto no início do século XX, mas pouca importância lhe foi dada, pela noção de que era o agente responsável por apenas doenças infantis simples e autolimitadas. Um vírus pertencente a família *Hesperiviridae* que hoje desperta grande interesse pelo fato de produzir infecções crônicas e induzir proliferação celular e câncer (Khanna et al., 1995; Kieff, 1996) sendo o agente etiológico da Mononucleose Infecciosa (MI) (Henle; Henle, 1979) e tendo sido descrito sua associação com Linfoma de Burkitt (Epstein, 1964), carcinoma nasofaríngeo (Tarr K, 1989), secundariamente em proliferação de célula B em pacientes imunossuprimidos (Purtilo, 1981) e numa variedade de outras condições.

O Linfoma de Burkitt (LB) constitui a primeira patologia a apresentar uma associação significativa com o EBV estando diretamente relacionado com as suspeitas a respeito de uma possível participação de agente infeccioso transmitido por insetos, devido a sua relação com as condições climáticas. Em 1964, o patologista inglês Sir Anthony Epstein demonstrou partículas virais em linfoblastos cultivados a partir de tecidos de linfoma de Burkitt (EPSTEIN, et al.1964). Posteriormente pesquisas sorológicas comprovaram a associação do EBV ao Linfoma de Burkitt africano e também ao carcinoma nasofaríngeo de certas populações orientais. (OLD, et al. 1966).

O EBV transforma células B eficientemente *in vitro* conduzindo o estabelecimento de linhagem celular linfoblastóide. Nessas células todos os genes ocultos até então, são expressos e dados atuais sugerem que a expressão de EBNA1, 2, 3A, 3C, LP e LMP1 seja crítica ou essencial para a imortalização. (KIEFF E, 1996). O EBV foi implicado no desenvolvimento de doenças linfóides severas. Recentemente foi reportada a detecção de células livres do seu DNA em soro ou plasma de pacientes com doenças associadas ao EBV, num estudo com abordagem principalmente qualitativa e com poucos dados quantitativos. Este estudo descreve uma mudança temporária de níveis do DNA viral em soro ou plasma de pacientes com doenças associadas ao EBV durante terapia usando PCR em tempo real. A íntima correlação entre esses níveis e a resposta terapêutica foi observada (LEI ;CHAN; CHAN; JOHNSON, LO YM, 2001).

Pela terceira década de vida mais de 80% das pessoas saudáveis são infectadas. A infecção primária é usualmente assintomática, mas quando a infecção é retardada até a adolescência, como é freqüente nos países desenvolvidos, o EBV causa Mononucleose Infecciosa em aproximadamente 50% dos casos. Como outros membros da família herpesvírus, EBV estabelece uma infecção persistente no hospedeiro. (RICKINSON, KIEFF, 1996). Em indivíduos saudáveis entre 1 e 50 de 10^6 células B são infectadas (KHAN et al, 1996) e o reservatório da infecção pelo EBV acredita-se residir no compartimento de células B de memória. (BABCOCK et al, 1998).

A infecção pelo EBV têm início no epitélio da orofaringe, sendo necessário uma molécula receptora específica, o CD 21, para a infecção dos linfócitos B, estando os mecanismos deste processo ainda não estabelecidos. O complexo gp 350/220 do envelope viral adere ao CD 21 e medeia a penetração viral. A gp 220 resulta da fragmentação de gp 350. Não foram detectados receptores para o EBV em células epiteliais normais e *in vitro* sua expressão tem sido inconsistente. Trânsito linfocitário através do epitélio e células dendríticas são hipóteses sugeridas; disseminação *in vitro* do EBV via fusão celular epitelial tem sido demonstrada (LIEBOWITZ & KIEFF: 1993). Sabe-se hoje que os Herpesvírus são capazes de latência, estão altamente disseminados na natureza incluindo nas populações mais remotas, existindo pelo menos um representante para cada espécie animal. Dos cerca de 100 vírus caracterizados, 9 foram isolados do homem: Vírus Herpes Simples 1 (HSV-1), Vírus Herpes Simples 2 (HSV-2), Citomegalovírus (CMV), Vírus Varicela- Zoster (VZV), Vírus de

Epstein-Barr (EBV) designados por EBV-1 e EBV-2, os Herpesvírus Humanos 6 e 7 (HHV-6 e 7) (ROINZMAN; WHITLEY; LOPEZ, 1993) o Herpesvírus Humano 8 (associado ao sarcoma de Kaposi) (GAO, et al., 1966) e o Herpesvírus B (comum em símios) (STRAUSS, SE: 1995). O EBV-1 é o tipo mais encontrado no ocidente enquanto na África observam-se os tipos 1 e 2. Na orofaringe de indivíduos ocidentais, entretanto pode-se detectar os dois tipos, porém é infreqüente a presença do EBV-2 no sangue periférico. Já na África, o EBV-2 é detectado em aproximadamente metade dos linfócitos B. A dificuldade em se encontrar a espécie EBV-2 no sangue periférico de indivíduos ocidentais saudáveis talvez decorra de menor gravidade deste subtipo refletindo-se em incapacidade para infectar os linfócitos sangüíneos (KHANNA, et al., 1995; KIEFF, 1996).

Existem duas formas de infecção pelo EBV, latente e lítica. A infecção lítica está associada com a produção de partículas virais e morte da célula hospedeira, já a infecção latente envolve a persistência viral e expressão de um grupo restrito de genes virais que incluem os seis EBNA (Epstein - Barr nuclear antigen), (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C, e LP) e três LMP (latent membrane protein do EBV), (LMP 1, 2A e 2B); em adição a duas pequenas moléculas de RNA não poliadenilados, o EBER, que é expresso em altos níveis (JARRET & MACKENZIE: 1999). Geralmente o EBV não se replica nos linfócitos (ciclo lítico), mas estabelece a infecção latente quer em forma integrada quer em forma episomal, conferindo imortalidade a célula (SCHOOLEY, 1995; KRIPALANI-JOSHI, 1994).

O EBV foi o primeiro vírus a ter seu genoma completamente sequenciado. O genoma viral é uma molécula linear de DNA, com dupla fita, de 172 kb, composta por 60% de guanina e citosina codificando cerca de 80 proteínas. O vírion mede de 180 a 200 nm ao microscópio eletrônico (LIEBOWITZ & KIEFF, 1993; SCHOOLEY, 1995).

Semelhante a outros herpesvírus, o EBV tem o seu genoma envolvido por uma cápsula protéica icosaédrica (capsídeo), formada por 162 capsômeros e envolvido externamente por um envoltório viral constituído de proteínas, lipídios e uma glicoproteína que o diferencia dos outros herpesvírus. As proteínas virais que formam o tegumento situam-se entre o nucleocapsídeo (genoma + capsídeo) e o envelope viral.

Os genomas dos tipos EBV-1 e EBV-2 são idênticos, exceto pelos genes que codificam as proteínas nucleares (EBNAs) e RNAs, conhecidos por EBERs (EBV encoded RNAs). Estes genes são produzidos durante a infecção latente. A seqüência de aminoácidos das proteínas nucleares EBNA2, EBNA3, EBNA4 e EBNA6 do EBV-1 diferem das do EBV-2 numa percentagem que varia de 16 a 47%. Poucas diferenças são encontradas na EBNA-5, pois a mesma é codificada por repetições de *exons* verificadas em ambos os subtipos. As diferenças entre os genes dos dois subtipos que codificam EBER não são bem conhecidas, porém suficientes para estabelecer diferentes espécies. Já as diferenças entre os genes que codificam as proteínas latentes da membrana (LMP1 e 2) são mínimas e não apresentam significado biológico (KHANNA R. et al.,1995; KIEFF,E.1966).

Os genes EBNA e LMP codificam proteínas nucleares e de membrana respectivamente. EBNA-1 tem seqüências repetidas em vários pontos do DNA celular, indicando que pelo menos parte dele possa ter origem no DNA humano. EBNA 2 e LMP 1 induzem a expressão de vários antígenos de ativação do linfócito B. LMP 1 também afeta o crescimento das células epiteliais, em parte, evitando a apoptose sendo também importantes imunologicamente, como alvo da resposta T citotóxica aos linfócitos B infectados (LIEBOWITZ & KIEFF: 1993; LIEBOWITZ: 1995).

Outros genes, como o BZLF1, o BHRF1 e o BCRF1, todos expressos durante a infecção lítica, manifestam homologia com genes celulares, e não são observados em outros herpesvírus. O BZLF1 está relacionado com os genes *jun/fos*, que são ativadores da transcrição; gene BHRF1 guarda semelhança com o gene *bcl-2*, regulador da apoptose e o BCRF1 é semelhante ao gen que codifica a citocina IL-10, que tem efeito supressor sobre a resposta imunológica celular. (MURRAY, et al.:1992; KHANNA ,et al.: 1995; KIEFF, 1996).

EBNA1, uma proteína envolvente do DNA é essencial para a replicação viral durante a latência e manutenção do genoma viral no episoma. Em adição, modelo de animal transgênico sugere que essa proteína tem propriedades oncogênicas (WILSON JB: 1992).

EBNA2 é um "transativador" de genes celulares, incluindo CD3, CD 21 e c-fgr e genes virais incluindo LMP 1.

LMP 1 comporta-se como um ativador da molécula CD 40 e esta proteína viral tem sido mostrado como sendo oncogênica em ensaios clássicos de transformação. Semelhante ao EBNA 2, a expressão de LMP1 induz alguns genes celulares, incluindo CD 23, CD 39, CD 40 , MHC de classe II e moléculas de adesão celular semelhantes a LFA- 1, LFA- 2 , e ICAM- 1 (KIEFF,1996). A expressão de LMP1 pode proteger as células B de apoptose e seu efeito imediato é de indução de *bcl-2* (HENDERSON S:1991).

Eliopoulos, et al. (2002), define LMP 1 como proteína pleotrópica cuja atividade inclui transformação em células no fenótipo, crescimento e grau de sobrevivência. A habilidade de LMP1 para intermediar alguns desses fenômenos pode ser atribuída a ativação do fator de transcrição NF- kappaB. LMP 1 promove a ativação de NF-kappa embora o recrutamento da proteína adaptadora TRAF-2 e a formação de um complexo multiproteico dinâmico inclua a NF-kappaBquinase, a IkappaBquinase e seus alvos.

1.3 Associação do EBV com LH

O vírus de Epstein-Barr (EBV) tem sido implicado na etiologia de um grande número de doenças. Evidências indiretas como a regressão parcial do LH em pacientes com infecção comprovada sorologicamente e tratados com aciclovir sempre apontaram para essa associação (BERILD, et al.,1984).

MACMAHON (1966) foi o primeiro a descrever a bimodalidade na incidência do LH, considerando-a uma patologia heterogênea e tornando a hipótese da natureza infecciosa mais evidente onde diante de achados como predominância do sexo masculino, ocorrência de uma maior número de casos em aglomerados populacionais, incidência familiar, padrão histológico, pico bimodal e prognósticos diversos considerou a existência de três subgrupos de doentes com base na idade do diagnóstico e estendendo o modelo para incluir o estudo do EBV. A primeira entidade é associada ao EBV, tem um pico de incidência em crianças com idade inferior a 10 anos de idade crescente até a idade limite de 15 anos, sendo de 85% dos casos do sexo masculino é principalmente do tipo LHCM, em países com condições sócio-econômicas menos favorável. A segunda entidade envolve, predominantemente, idosos estando também associada ao EBV, sendo o subtipo LHCM predominante assim como o sexo masculino e mostra menos variação geográfica. Nesse grupo a doença é claramente tumoral.

O terceiro grupo envolve os casos de adultos jovens entre 15 e 34 anos, com os indivíduos apresentando elevado padrão sócio-econômico e não associada ao EBV e usualmente do tipo LHEN afetando ambos os sexos igualmente.

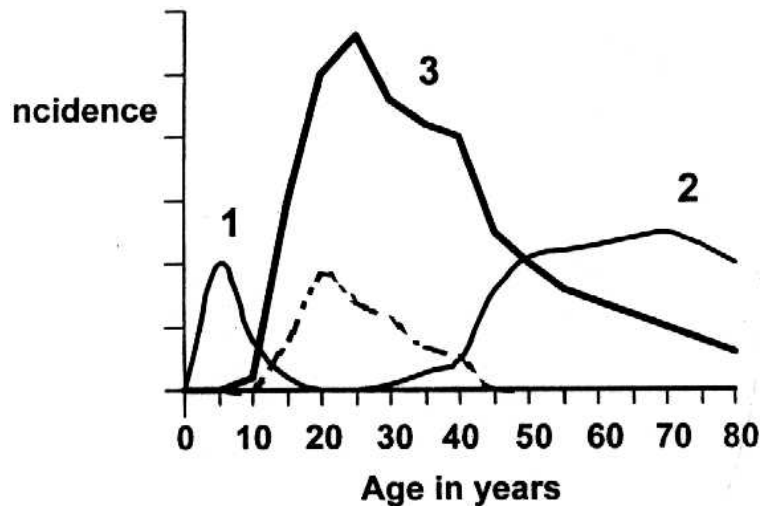


Gráfico 1 : Modelo de três linhas para LH

Fonte: Seminars in Hematology, vol 36, No3 (July), 1999: pp 260-269.

Epstein Barr Virus and other Candidate Viruses in the Pathogenesis of Hodgkin disease. Ruth F. Jarrett and Jane Mackenzie.

O modelo dos três grupos de LH explica que magnitude de cada entidade é variável, assim, em países em desenvolvimento haverá uma maior proporção de casos do grupo 1, e uma proporção menor de casos do grupo 3, comparados com países desenvolvidos. Dados recentes sugerem uma quarta entidade associada ao EBV, o qual responde por um pico na faixa etária de adulto jovem e é relacionado a infecção tardia pelo EBV. Assim, países com um pico no adulto jovem (como os Estados Unidos e Reino Unido) terá uma proporção global mais baixa de EBV HRS+ que países com uma incidência mais alta de LH em infância (como no Peru). Esta afirmativa é consistente com a maioria dos resultados de trabalhos disponíveis (MACMAHON B, 1966; QUINTANILLA-MARTINEZ L et al, 1994).

As diferenças nas taxas de associação ao EBV são bastante relacionadas ao subtipo histológico, à idade e ao grupo étnico (CARBONE, et al, 1993). Em particular, hispânicos

apresentam LH mais provavelmente associado ao EBV. Na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) a taxa de incidência para LH é aumentada 7,6 vezes e a sua ocorrência neste contexto universalmente associada ao EBV. Após transplante e em pacientes com imunodeficiências congênitas ocorre um risco aumentado de LH sendo essa também associada ao EBV.

Para tentar explicar a bimodalidade, MacMahon propôs que o LH resultaria de dois mecanismos distintos. Uma forma observada entre adultos jovens que seria causada por um agente biológico de baixa infectividade e outra encontrada entre idosos que teria uma gênese semelhante aos outros linfomas.

Levine et al (1971), detectaram títulos de anticorpos anti-EBV significativamente mais elevados em pacientes com LH (1:367) que naqueles com outros linfomas (1:132) e nos controles normais (1:190) confirmando a hipótese de MacMahon.

O envolvimento do EBV na patogênese do LH, têm sido enfatizado desde 1970 quando evidências baseadas na epidemiologia sugeriram a sua existência em pacientes com LH que apresentavam altos títulos de anticorpos contra o seu antígeno (JOHANSSON, 1970; MUELLER, et al. 1989).

Um pequeno percentual desses pacientes é soronegativo para o EBV e o seu papel na linfomagenese da doença permanece obscuro, entretanto Hibridização Southern Blot demonstrou que o DNA do EBV está presente em mais de 25% das biópsias de LH (WEISS L. et al., 1987; 1989). Na América do Norte e Europa Ocidental os casos de LH associados ao EBV variaram entre 26% e 50% (HERBST, et al,1992) sendo que a taxa de positividade para Linfoma de Hodgkin Celularidade Mista (LHCM) variou de 32 a 96%, com muitos estudos informando taxas de 50%.(PALLENSEN, et al.,1991) contrastando com os casos de Linfoma de Hodgkin Esclerose Nodular (LHEN) onde essa proporção é muito mais baixa variando de 10% a 50%.(CARBONE, et al., 1993, MURRAY,1992) concluindo-se que a positividade estar claramente associada ao subtipo histológico. Quase todos os estudos demonstraram que os casos de LHCM estão mais provavelmente associadas ao EBV que os casos LHEN (BROUSSET, et al., 1993).

Wright, et al. (1991) através de análise de amostras por Reação Cadeia de Polimerase (PCR) mostrou o DNA viral em alta proporção de casos, variando entre 60 e 80%.

EBV tem sido detectado em células diagnósticas de LH por sondas de DNA em hibridização in situ (HIS) (BROUSSET, et al.1991; WEISS, et al, 1991, DELSOL, et al, 1992) ou por imunohistoquímica (IHC) com o uso de anticorpo monoclonal contra a sua proteína (PALLESEN, et al., 1991). A aplicação de técnicas padrão de imunohistoquímica para a descoberta de vírus herpes é complicada pelo ciclo lítico e fase latente do ciclo de vida viral. A proporção da detecção viral é dependente da sensibilidade da técnica utilizada e do modo de processamento do tecido. HIS usando sonda de DNA não- isotópica BamHI W em tecido de LH embebido em parafina estabeleceu uma baixa incidência de casos positivos para EBV (BROUSSET, et al, 1992). A escassa sensibilidade desse procedimento é provavelmente devido ao pequeno número de cópias de DNA por célula sendo um efeito da fixação no DNA viral (BROUSSET, 1991). Os efeitos adversos da fixação também se aplicam aos anticorpos para identificação do EBV na imunohistoquímica.

1.4 EBV e outras patologias associadas.

1.4.1 Carcinoma nasofaríngeo (CNF)

Muitas neoplasias humanas estão relacionadas à infecção pelo EBV, dentre elas estão o carcinoma indiferenciado de nasofaringe (CNF) e o linfoma de Burkitt (LB). Em ambos os tumores os estudos por HIS mostram positividade em virtualmente todos os núcleos das células neoplásicas. O CNF é um tumor de origem epitelial, com distribuição bem definida entre diferentes grupos étnicos. Tem prevalência elevada no sudeste da China, onde é o tipo de câncer mais comum nos adultos, sendo raro em crianças, ao contrário, de algumas partes da África onde é o principal câncer na infância. Nos Estados Unidos, por outro lado é uma neoplasia extremamente rara tanto em crianças quanto em adultos. Os estudos de PCR e os altos níveis séricos de anticorpos anti- EBV nos pacientes com CNF primário ou recorrente e a ausência do EBV em células epiteliais normais também confirmam esta associação (KIEFF, 1995; OLD, et al.1966; PATHMANATHAN, et al. 1995). A sofisticação de técnicas como PCR não substituíram a sorologia que ainda é extremamente valorizada e alguns autores

sugerem a sua utilização para diagnóstico de casos precoces (MATHEW, al., 1994; FONESTAN, et al., 1994).

1.4.2 *Mononucleose Infeciosa (MI)*

Indicações de que o EBV era associado com LH veio da observação de histórias passadas de que pessoas com MI apresentavam um maior risco de desenvolver LH (IARC Working Group, 1997) e que os pacientes de LH tinham elevado título de anticorpo contra antígenos de EBV(LEVINE et al, 1971) Embora estas associações sejam claras, essa relação a partir de dados moleculares mais recentes é mais complexa havendo histórias de pacientes com quadro passado de MI que desenvolveu LH negativo para EBV (MACK; COZEN; SHIBATA, et al, 1995).

Em geral os altos títulos de anticorpos heterófilos contra o EBV em LH parecem preceder o desenvolvimento de doença (MUELLER, et al, 1989) mas dados publicados, não tem mostrado que casos associados ao EBV tem títulos mais altos que os não associados (DELSOL, 1992).

Mais de 50% dos casos de infecção primária pelo EBV em adolescentes e adultos jovens manifesta-se na forma de MI (KHANNA, et al.1995) É característico da doença uma linfocitose atípica, com leucometria variando de 12000 μ l a 18000 μ l, dos quais 60% são linfócitos. As manifestações clínicas mais comuns compreendem febre, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia e faringite. Nos países desenvolvidos, a MI é mais comum entre adolescentes e adultos jovens de classes sociais mais abastadas, a maioria com mais de 10 anos de idade, enquanto que nos países subdesenvolvidos ela é mais observada em crianças, onde quase todas estão infectadas antes de concluir o primeiro ano de vida e evolução clínica assintomática (CONTRAN, et al., 1994; ABREU, 1996). Células semelhantes a RS podem ser encontradas em pacientes com MI.

1.4.3 *Linfoma de Burkitt (LB)*

É uma neoplasia de célula B de alto grau cuja apresentação clássica é de um tumor extralinfático que se origina na mandíbula ou maxila em crianças africanas (BURKITT, 1958)

tendo predileção também pelas vísceras abdominais, particularmente os ovários, bem como as mamas e meninges e cuja associação com o vírus foi sugerida por Burkitt em 1952. De fato o EBV somente foi descoberto dois anos mais tarde em linhagem celular de amostras de LB da Uganda (EPSTEIN; ACHONG; BARR, 1964).

O EBV é um achado consistente em células desse linfoma que é endêmico na África Central, sendo a malária considerada um com fator patogênico. Em contraste, menos de 20% de casos de LB ocorrido em países ocidentais são associados ao EBV. A doença predomina no sexo masculino apresentando-se em crianças africanas aproximadamente aos sete anos de idade enquanto em crianças americanas aos nove anos (DE VITA & ULTMANN, 1988).

O processo infeccioso no LB ocorre em três estágios distintos caracterizados primeiro por uma infecção primária, com comprometimento de linfócitos B imaturos; segundo pela participação de fatores ambientais e sociais que entram na facilitação da infecção, como a malária e a AIDS que funcionam como potentes estimuladores de hiperplasia de linfócitos B ou supresores da resposta celular T e por último o terceiro estágio que envolve a translocação da parte distal do cromossoma 8 para o cromossoma 14 (ou cromossoma 2 ou 22), provocando a desregulação do oncogene c-myc e subsequente proliferação monoclonal do linfócito B, resultando no LB (KHANNA et al., 1995).

Estudo realizado com pesquisa de EBV em 54 casos de LB da região nordeste do Brasil, mais precisamente do estado da Bahia através de hibridização in situ, imunohistoquímica e PCR, tendo como controle dez casos da Alemanha, teve como resultado uma positividade de 87% no Brasil e 20% na Alemanha (ARAÚJO; FOSS; BITTENCOURT, et al, 1996).

1.4.4 Outras neoplasias

Na África é alta a incidência de câncer de mama em homens, coincidindo com a zona endêmica de malária e linfoma de Burkitt. Labreque, et al. (1995) descreveram que no Brasil e mais precisamente na cidade de Recife, na região nordeste do país é onde ocorre a

mais alta incidência de carcinoma de mama masculina do mundo. Na Inglaterra até 21% dos carcinomas de mama masculina mostraram positividade para o EBV pesquisado por PCR.

A relação entre imunossupressão e atividade viral agressiva é bem conhecida. Pacientes transplantados apresentam síndromes clínicas relacionadas à presença do EBV caracterizada por quatro grupos (NALESNIK et al. (1988).

- 1) pacientes jovens com transplante recente e quadro de mononucleose- símile
- 2) pacientes mais velhos (idade média em torno de 47 anos), transplantados há vários anos, com massas tumorais extra-nodais
- 3) pacientes com lesões linfoproliferativas confinadas ao Sistema Nervoso Central(SNC)
- 4) pacientes com lesões linfoproliferativas do trato gastrointestinal.

O risco de um transplantado renal desenvolver linfoma é 40 vezes maior que a população controle e está associada com alta taxa de soroconversão para o EBV. Na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) o EBV tem papel importante na gênese dos linfomas (GUNTHER et al. 1994; HERNDIER et al., 1994) afirmaram que pacientes com AIDS tem risco cinco vezes aumentado de desenvolver LH, que evolui no caso de maneira agressiva, menos responsiva ao tratamento, sendo freqüentemente extra-nodal com expressão do EBV em virtualmente 100% dos casos. Bacchi et al. (1996), em seu estudo no Brasil demonstrou que 55% dos casos de Linfoma Não Hodgkin e 75% dos casos de LH em pacientes com AIDS demonstraram relação com o EBV (BACCHI et al., 1996).

1.5 Associação do LH com o EBV considerando sua distribuição no Brasil e no Mundo

A epidemiologia do LH tem comportamento peculiar principalmente no aspecto social onde se percebe diferentes apresentações variáveis com regiões geográficas mais ou menos desenvolvidas. Essa variação atinge também os subtipos histológicos sendo que nos países em desenvolvimento o primeiro pico ocorre na infância e outro na senilidade com o subtipo LHCM mais freqüente e em países desenvolvidos o primeiro pico ocorre em adultos jovens com idade entre 15 e 34 anos e o subtipo mais comum é o LHEN (LEITE, 1988). Diferenças no padrão de incidência entre países desenvolvidos e em desenvolvimento foram

descritos anos atrás sendo recentemente reavaliados (MACFARLAN; EVSTIFEEVA; BOYLE; GRUFFERMAN, 1995).

Dependendo da localização geográfica e da idade do paciente o LH está associado ao EBV, principalmente EBV A em 20% a 100%. Essa alta prevalência ocorre em crianças de países em desenvolvimento (DIRNHOFER; ANGELES-ANGELES; ORTIZ-HIDALGO, et al., 1999).

O LH é uma patologia relativamente pouco comum com taxa de incidência de 2.8 e 2.4 por 100,000 nos Estados Unidos da América (E.U.A.) e Reino Unido respectivamente (RIES; MILLER; HANKEY, 1994; CARTWRIGHT; ALEXANDER; MCKINNEY; RICKETTS, 1990). A taxa de incidência internacional varia de aproximadamente 3 a 4 vezes, com exceção dos países asiáticos nos quais o LH é menos comum.(PARKIN; MUIR; WHELAN, 1992). Esse nível de variação internacional é pequeno quando comparado com alguns outros cânceres, contudo o padrão de incidência mostra variação marcante quando analisado com referência a subtipo histológico, idade, localização geográfica e raça.

Abreu, 1996 em seu trabalho no Brasil (Ceará) com Linfoma de Hodgkin infanto-juvenil (< 18 anos) e sua associação com o EBV encontrou predominância do subtipo LHCM (64,7%) seguido do LHEN (29,41%), com positividade total para o EBV de 85,29% e sendo o subtipo LHCM o mais freqüentemente associado ao EBV (100%).

Leite, 1998 fazendo um estudo analítico da associação do LH com o EBV no estado do Ceará e comparando com regiões de nível sócio- econômico diferentes, concluiu que no Ceará o subtipo predominante sobre tudo na faixa etária menor que é 10 anos é o LHCM. A prevalência do EBV nesse estudo foi alta (70%) sendo o subtipo LHCM o que apresentou maior positividade (89,28%) e por fim verificou-se a existência de uma relação inversamente proporcional entre condições sócio- econômicas e positividade para o EBV nos subtipos LHCM e LHEN.

Oliveira, et al. (2002) estudaram 96 casos de LH em grupos adulto e juvenil comparando regiões brasileiras distintas como São Paulo e o Ceará onde encontraram uma alta positividade total para o EBV no Brasil , sendo de 64% para o subtipo LHCM e 12% para

o subtipo LHEN para o grupo jovem do Ceará , para o grupo adulto do Ceará 19% LHEN e 12% LHCM, para o grupo juvenil de São Paulo 52% LHCM, 3% LHEN e para o grupo de adultos de São Paulo 47% de LHCM.

Ambinder, et al. (1993) em seu estudo comparativo entre população infantil de Honduras e dos E.U.A., provaram haver entre os hispânicos uma associação viral de 100% contra 36% dos americanos. O subtipo LHCM foi o mais freqüente em Honduras contrariamente aos casos americanos onde predominou o LHEN (AMBINDER, et al., 1993).

No mesmo período Armstrong, et al. (1993) num estudo de 55 casos de crianças com idade abaixo de 10 anos de diferentes países com LH, distribuídos em 22 casos do Reino Unido, 25 casos do Brasil (São Paulo) e 8 da Arábia Saudita, encontraram o EBV em 38 sendo 13 do Reino Unido ,18 do Brasil e 7 da Arábia Saudita. O subtipo histológico LHCM foi o mais comum para o Brasil e Arábia Saudita sendo o de maior positividade para o EBV (7/7 Reino Unido, 10/12 Brasil e 5/5 Arábia Saudita). O subtipo LHEN foi o mais freqüente no Reino Unido com uma positividade de 33,3%.

Chang, et al (1993), em sua pesquisa de EBV no Peru e utilizando a técnica de Hibridização in situ detectaram-no em 94% dos casos pesquisados, sendo os positivos 25 do sexo masculino e sete do sexo feminino com idade de 9 anos. O subtipo histológico mais visto foi o LHCM (63%) correspondendo à pacientes com idade inferior a 21 anos sendo seguido do LHEN com 22%.

A prevalência das categorias localização geográfica, idade e raça foram avaliadas por Gulley, et al., 1994 onde concluíram que os dois primeiros são variáveis menos importantes no LH. Nesse estudo foram analisados 125 casos (79 dos E.U.A ., 31 do México e 15 da Costa Rica) pelo método de HIS usando sonda EBER 1 e encontrado positividade nas células RS em 48% dos casos assim distribuídos: 27/ 74 dos casos dos E.U.A. correspondendo a 36%; 24/31 dos casos do México (77%) e 5/14 casos da Costa Rica (36%). A positividade foi maior entre os hispânicos (59%) quando comparada com os não-hispânicos (23%) e aqui também o subtipo mais fortemente positivo para o EBV foi o LHCM.

Osorno, et al., (1994) em estudo de 27 casos de LH no México investigaram a presença do EBV usando Hibridização *in situ* com sonda EBER 1 e imunohistoquímica com todos os casos sendo positivos para CD 30 (Ber-H2) e 18 casos expressando CD 15. A seqüência do vírus foi identificada em 18 / 27 casos (67%) e a positividade relacionada com o subtipo histológico foram de 46% para o LHEN, 100% para LHCM e 83 % no LHDL. Os pacientes tinham entre 5 e 65 anos com idade média de 29 anos.

Belkaid, et al. (1995) em seu estudo sobre a associação do EBV com LH através de técnicas de imunohistoquímica, Hibridização *in situ* e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foram responsáveis por um dos poucos trabalhos onde faz-se uma análise comparativa entre resultados de pacientes originados de países diferentes no caso França e Argélia . Sessenta e oito pacientes soronegativos para a AIDS foram avaliados, sendo 47 de origem argelina (AL) e 21 de origem francesa (Fr) cujas características iniciais foram predominância do sexo masculino e idade média 26 anos. A HIS apresentou resultado positivo de 66% dos casos da Argélia e 29% dos casos da França. A positividade afetou no total 61% dos casos LHCM contra 20% dos outros tipos.

Preciato et al. (1995) em trabalho realizado na Argentina com casos de LH na infância com idade média de 7 anos, estudaram 41 casos sendo 25 do tipo LHCM, 9 LHEN, 1 LHDL e seis de LHPL (Não- Clássico) encontrando positividade para o EBV em 22 dos 41 casos (54%). Foram pesquisados EBER e LMP1 por HIS e Imunohistoquímica respectivamente encontrando-se 20 casos EBER+/ LMP+, 2 casos EBER+/ LMP- e 19 foram EBER-/LMP- entretanto nenhum dos 41 casos expressou EBNA 2. Houve predomínio do sexo masculino e o subtipo LHCM foi o mais associado ao EBV (19/25 EBER+; 17/25 LMP+). Dos dois grupos constituídos de faixa etária diferentes sendo o primeiro de 2 a 6 anos e o segundo de 7 a 15 anos, no grupo mais jovem a associação com o vírus foi significativamente mais forte.

Estudo de 87 pacientes com LH na Coréia onde foi avaliado clínica, morfologia e aspectos imunohistoquímicos através de HIS e imunofenotipagem mostraram expressão do EBV RNA (EBER: EBV- encoded RNA) em 60 de 87 casos (69%) e LMP 1 em 39 de 87 casos (45%). O subtipo LHCM foi o de maior positividade para o EBV (75%) não se observando diferença significativa com relação ao sexo (HUH et al., 1996).

Weinreb, et al (1992) examinaram material de 101 pacientes do Quênia, sendo 53 menores de 16 anos e 48 maiores de 16 anos, encontrando uma positividade para o EBV de 100% no grupo menor de 16 anos e de 63% no maior de 16 anos.

Peh, et al (1996) estudaram uma população multi-étnica na Malásia num total de 100 casos de LH, divididos em dois grupos de 34 e 66 com idade inferior e superior a 15 anos respectivamente. A distribuição étnica dos casos de LH Clássico nesse estudo foi Malásia: 23, China: 32 e Índia: 30. No grupo dos pacientes com idade inferior a 15 anos encontraram uma prevalência do EBV em 93% e o subtipo predominante foi o LHCM (47%) sendo de apenas 52% no grupo com idade superior a 15 anos e um maior número de subtipo LHEN (51%).

Razzouk, et al (1997) em estudo comparativo de casos de LH no Brasil (Curitiba) e E.U.A, com amostras equilibradas com relação a subtipos histológicos encontraram uma positividade do EBV em 58% dos casos em ambos, não havendo no caso diferença significativa referente a localização geográfica, entretanto a presença viral foi mais marcante nos pacientes de idade inferior a 10 anos. Dos casos brasileiros incluídos nessa faixa etária, 74% foram positivos para o EBV e apenas 15% daqueles de idade superior foram positivos para EBER1, o mesmo ocorrendo nos casos americanos com percentuais de 76% e 22% respectivamente.

Dumaz, et al. (1998) em estudo sobre a detecção do genoma do EBV por PCR em 40 casos de LH na Turquia divididos em 33 pacientes do sexo masculino e sete do sexo feminino todos com idade média de 28 anos verificaram que o subtipo LHEN foi o mais freqüente (40%), sendo 22 dos 40 casos positivos para o EBV dando um percentual de 55%.

Bosch, et al (2000) estudando a etiopatogênese do LH em Tarragona (Espanha) com amostra de 49 pacientes que foram avaliados por imunohistoquímica (LMP 1) e Hibridização in situ (EBER 1) encontraram uma associação em 20 casos dos 49 (40,8%). Esse percentual foi alto, mas não significativo no subtipo LHCM e foi significativamente alto em pacientes com idade acima de 55 anos.

Macak et al. (2000), estudando a detecção do EBV em LH na República Tcheca demonstraram haver variabilidade geográfica. Utilizando imunohistoquímica e HIS de 142 casos de LH com idade variando entre 4 e 82 anos encontraram uma positividade para o EBV de 33% e predomínio do sexo masculino. O subtipo histológico mais freqüente foi o LHEN (64 casos) seguido do LHCM (62 casos).

Zhou, et al. (2001) estudando casos de LH pediátrico na China e sua associação com o EBV encontraram uma positividade para o EBV de 72% sendo as crianças do sexo masculino mais acometidas e mostrando subtipo LHCM.

1.6 Importância da Pesquisa

Nosso trabalho foi realizado de modo a fazer uma análise comparativa de uma amostra de 118 casos de Linfoma de Hodgkin clássico (LHc) de origem do Ceará - Nordeste do Brasil e da França sendo todos os pacientes de faixa etária entre 18 e 64 anos de idade. Com o propósito de convencionar parâmetros para análise comparativa e interpretação de resultados, buscamos alguns trabalhos de pesquisadores cujo objetivo maior era de avaliar o percentual dessa associação nos respectivos países. Durante realização da pesquisa para desenvolvimento da revisão de literatura verificamos uma escassez de trabalhos comparando dois ou mais países e os que assim o fazem, envolvem pacientes de faixa etária distinta englobando em mesmo grupo, pacientes crianças, adolescentes e adultos.

Oliveira, et al. (2002) estudaram LH comparando duas regiões de um mesmo país, no caso o estado do Ceará que economicamente é semelhante aos países em desenvolvimento e o Estado de São Paulo economicamente semelhante a países desenvolvidos. Em seu estudo avaliaram 96 casos de LH de pacientes com faixa etária desde mais jovem que vinte anos até acima de vinte anos, o que torna uma amostra bastante heterogênea.

Belkaid, et al. (1995) em seu trabalho sobre associação do LH com o EBV comparando casos da Argélia e da França avaliaram uma amostra intensamente heterogênea, sendo incluído no grupo de pacientes da Argélia pacientes de 6 a 70 anos de idade, enquanto o grupo de pacientes franceses apresentou faixa etária mais homogênea sendo de 20 a 52 anos de idade.

Em vista da heterogeneidade das amostras estudadas por trabalhos anteriores surgiu a certeza da necessidade de um estudo com amostra homogênea incluindo apenas um grupo onde optamos por pesquisar a relação do LHe com o EBV no grupo adulto com faixa etária entre 18 e 64 anos e fazendo a devida comparação com países de condição sócio-econômica diferente buscando obter um resultado mais consistente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Fazer investigação da associação do LHc com o EBV de uma região subdesenvolvida representada por casos da cidade de Fortaleza, estado do Ceará- Brasil e de país desenvolvido representado por diferentes regiões da França.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 *Determinar o grau de associação do EBV com LHc , levando em consideração os fatores abaixo descritos:*

- a) Faixa etária;
- b) Sexo;
- c) Localização anatômica;
- d) Tipo / subtipo histológico.

2.2.2 *Correlacionar a presença do EBV com os subtipos histológicos do Linfoma de Hodgkin clássico;*

2.2.3 *Fazer uma análise comparativa da associação do LHc e EBV em pacientes adultos com idade entre dezoito e sessenta e quatro anos.*

2.2.4 *Observar a possível existência de correlação entre situação econômica das regiões subdesenvolvidas e desenvolvidas envolvidas no estudo em questão e a presença de EBV no LHc.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

Para efetivação do presente estudo foram selecionados espécimes de biópsia cirúrgica de 118 casos de pacientes adultos com faixa etária entre 18 e 64 anos com diagnóstico morfológico de LHc e imunofenotipados . Os casos foram obtidos de instituições médicas localizadas em Fortaleza - Ceará como o Hospital Universitário Walter Cantídio , Instituto do Câncer do Ceará e Central de Análises Clínicas (C.A .C.); os 52 casos da França derivam do Hospital Laenaec, Université Paris V. Todos os casos ocorreram no período entre 1999 e 2002. O diagnóstico morfológico de LH pode ser confirmado após revisão das secções histológicas e fenotipagem por imunohistoquímica, por três hematopatologistas.

3.2 Metodologia

3.2.1 Estudo morfológico

Foram realizados em 118 casos de biópsias ganglionares para pesquisa da presença do EBV, sendo 66 do Brasil e 52 da França.

O diagnóstico histológico dos casos estudados foi estabelecido pelo encontro da célula diagnóstica do LHc ou formas variantes, em meio a substrato celular característico e alterações estromais utilizando critérios morfológicos e de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde de 2001(JAFFE,ES., HARRIS NL., STEIN H., VARDIMAN JW,2001) tendo sido obtidos de tecidos fixados em formalina a 10%, desidratados em gradiente de etanol, clareados em xilol e submetidos a cortes pelo micrótomo de cerca de 5 µm de espessura após o qual foram pescados em banho-maria por lâmina de vidro usada na rotina para microscopia óptica, mantidas durante uma hora em estufa a temperatura de 60 graus para posterior processamento imunohistoquímico. O diagnóstico e a subclassificação do LH foram feitos por três patologistas portadores de alta titulação e treinados na área.

3.2.2 Estudo Imunohistoquímico

No presente trabalho, o estudo imunohistoquímico foi realizado em 66 casos de LH do Ceará e 52 casos da França usando a técnica estrepto-avidina-biotina-peroxidase de cortes histológicos de tecido linfóide fixados em formalina incluídos em parafina, cortados em micrótomo e pescados do banho-maria por lâminas silanizadas e posteriormente submetidos ao forno microondas para o processamento de recuperação antigênica.

Os blocos de parafina selecionados foram cortados na espessura de 4 a 5 μm antes da realização da técnica de imunohistoquímica (IHQ), sendo posteriormente hidratados e lavados com solução salina tamponada (SST), pH 7,4. O material desparafinado foi incubado em forno microondas por 15 minutos em solução tampão citrato, pH 6,4 para recuperação antigênica, conforme descrito por Gown et al. (1993). Em seguida os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos primários:

- a) Anticorpo monoclonal LC3D1 (CD 15) -(Catálogo N^o M 733, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia ,EUA)
- b) Anticorpo monoclonal BerH2 (CD 30) – (Catálogo N^o M 751, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia , EUA)
- c) Anticorpo monoclonal L26 (CD 20) - (Catálogo N^o M 774, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia,EUA)
- d) Anti-LMP-1 - (Catálogo N^o M897, Dako Corp., Carpinteria, Califórnia , EUA)

Os anticorpos foram diluídos na concentração de 1: 40 (anti- CD 30), e 1: 50 (anti-LMP1) e incubados por pelo menos 12 horas durante a noite (*overnight*) à temperatura aproximada de 4^o C. Após a lavagem em SST, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado anti – IgG de camundongo – N^o BA2000, Vector Corp. Burlingame, Califórnia, EUA), produzido em cabra e utilizado na diluição de 1:200. A seguir os cortes foram incubados com o complexo ABC Elite[®] (Catálogo N^o PK6100, Vector Corp. Burlingame, Califórnia, EUA) por 45 min. O complexo ABC foi preparado seguindo a orientação do fabricante e constou de solução na proporção de 5 μl de avidina com 5 μl de biotina em 5 ml de SST. Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3` diaminobenzidina (DAB, 1mg/ml) (Catálogo N^o D5637, Sigma Chemical Company,

St. Louis, Missouri, EUA) na concentração de 1 mg/ ml em trizma (Catálogo N^o T1503, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, EUA) e em solução de H₂O₂ (Catálogo N^o H1009, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EUA) a 0,1%.O material foi contra - corado com Hematoxilina de Harris por aproximadamente 5 minutos. Com exceção da incubação em forno de microondas e da incubação overnight dos anticorpos primários, todas as demais incubações foram feitas à temperatura ambiente.

3.2.3 Controles da técnica de Imunohistoquímica

Controle positivo: Cortes histológicos de um caso com diagnóstico morfológico e imunofenotipagem positivo para Linfoma de Hodgkin e EBV em experimentos anteriores.

Controle negativo: realizado com a retirada da reação do anticorpo primário.

3.2.3.1 Técnica de Imunohistoquímica (em anexo)

3.2.4 Estudo por Hibridização *in situ* (HIS)

A verificação da presença do EBV em 37 casos de LH do Ceará e 33 casos da França foi realizada utilizando a técnica de Hibridização *in situ*, utilizando sonda DNA de nucleotídeo de 30 bases, complementar ao segmento do gene EBER1 que constitui a região do genoma do EBV que é ativamente transcrito em células latentemente infectadas. A sonda de oligonucleotídeo foi manipulada e trabalhada de acordo com o método descrito na literatura por Weiss et al,1991.

3.2.5 Técnica de hibridização *in situ* (em anexo).

3.2.6 Interpretação dos resultados das reações de IHQ e HIS.

A interpretação dos resultados foi feita através de microscópio óptico comum. Na imunohistoquímica os antígenos pesquisados em nosso trabalho localizam-se na membrana

plasmática tendo sido considerados positivos os casos com nítida marcação na superfície celular ou para-nuclear tipo Golgiana.

Na HIS a sonda EBER se liga a fragmentos de RNA viral transcrito presentes no núcleo das células RS e variantes podendo ser encontrada ocasionalmente em linfócitos de fundo. O resultado positivo para HIS foi avaliado de acordo com sinal nuclear positivo lembrando que para um resultado ser considerado negativo é essencial avaliar o grupo controle processado paralelamente ao grupo pesquisado para avaliar erros de técnica e porque às vezes o cromógeno oblitera todo o núcleo. Nenhum sinal citoplasmático foi visto em células tumorais.

4 RESULTADOS

a) Dados clínicos e morfológicos

Foi estudado um total de 118 casos de LHc com diagnóstico morfológico sendo 66 do Ceará – Brasil e 52 da França. Os pacientes apresentaram uma idade média total de 41 anos. Dos casos brasileiros 42,4 % eram do sexo masculino com idade média de 30 anos, sendo o restante (57,5%) do sexo feminino e mostrando idade média de 32,1 anos. Na França o total de casos foi de 52 divididos em 63,4 % de pacientes do sexo masculino com idade média de 37 anos e 36,5% de pacientes do sexo feminino com idade média de 29,7 anos

b) Análise Histológica subtipos de LHc e distribuição):

O estudo dos subtipos histológicos mostrou uma prevalência do LHEN em ambos os países sendo em número de 38 para o Brasil correspondendo a 57,5% e de 43 para a França (82,6%). A idade média para esse subtipo foi estabelecida em 28,9 para o Brasil e 34,1 para a França. O segundo subtipo em termos quantitativos foi o LHCM sendo 25 casos do Brasil (37,8%) com idade média de 28,9 e 05 (11,6%) casos da França com idade média de 38,8 anos. O subtipo LHDL foi presente apenas na amostra brasileira com 01 caso (1,5%) apresentando média de idade de 26 anos. No total 06 casos não foram classificados sendo 02 do Brasil e 04 da França.

Os dados citados acima estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2: Linfoma de Hodgkin : dados morfológicos e clínicos

	Brasil	França	Idade Média(anos)
<u>Casos (total)</u>	66	52	41,0
IH e HIS (casos estudados)	37 (56,0%)	33 (63,4%)	34,81
Homens	28 (42,4%)	33 (63,4%)	30,0 / 37,0
Mulheres	38 (57,5%)	19 (36,5%)	32,1 / 29,7
<u>Tipos Histológicos</u>			
Esclerose de Nodular (EN)	38	43	28,7 / 33,1
Celularidade Mista (CM)	25	05	35,5 / 38,8
Depleção linfocítica (DL)	01	-	26,0 / 0,0
Não classificado (NC)	02	04	29,5 / 45,5
TOTAL	66	52	

c) *Análise imuno- histoquímica dos marcadores linfóides*

Dos 118 casos obtidos inicialmente com diagnóstico morfológico de LH conseguimos seguir para o estudo do nosso trabalho apenas 70 casos foram selecionados para o estudo da relação com o vírus EBV devido problemas com localização e acesso aos blocos de parafina. Todos esses casos foram confirmados como LH por estudos morfológicos e por imunohistoquímico sendo encontrada positividade nos anticorpos classicamente descritos na literatura para o LH Clássico como CD15 e CD 30 positivo e CD20 negativo. (POPPMA, 1992; SAID, 1992 WARNKE, 1992) Todos os casos do Brasil e da França mostraram expressão de CD 30 positivo (Brasil= 66/66, França =52/52). O CD 15 foi expresso em 87,8% dos casos brasileiros e em 75% da França (Tabela 3). Nenhum caso apresentou positividade para CD3, entretanto 4,5% dos casos do Brasil (3/66) foram CD 20+.

Tabela 3: Expressão dos antígenos CD30, CD15 e do vírus EBV (LMP1 e HIS) nos casos de LH do Brasil e da França.

Grupo	CD 30	CD 15	LMP1	EBER1
Brasil (n=66)	66/66(100%)	58/66 (87,8%)	25/37(67,5%)	28/37(75,6%)
França (n =52)	52/52 (100%)	39/52 (75%)	10/33(30,3%)	10/33(30.3%)

D) Positividade para o EBV com IHQ e HIS de acordo com a localização geográfica e tipo histológico.

Do Brasil 15/23 (65,2%) casos de EN, 8/11 (72,7%) de CM, 1 nc e 1 DL expressaram o antígeno LMP1; enquanto nos casos da França este antígeno esteve presente em 6/29 casos de EN (20,6%) e 4/4 (100%) de CM.

Após realização da HIS observamos com os casos do Brasil uma relação com o EBV em 16/23 de EM (69,5%), 10/41 de CM (90,9%), 1 DL e 1 nc. Em relação aos casos da França os resultados com o LMP1 e HIS foram idênticos. Os dados com o LMP1 e HIS no total são vistos na tabela 3 e divididos de acordo com o tipo histológico na tabela 4.

Da totalidade de casos estudados no Brasil e na França em apenas três não houve concordância nos resultados entre LMP1 e EBER.

Tabela 4 - Resultado d a IHQ e HIS de acordo com a positividade considerando subtipo histológico e localização geográfica (Br = Brasil; Fr= França)

	LMP1 (n = 70)				HIS (n = 70)			
	Br +	Br -	Fr +	Fr -	Br +	Br -	Fr +	Fr -
EN	15	08	06	23	16	07	06	23
CM	08	03	04	-	10	01	04	-
DL	01	-	-	-	01	-	-	-
NC	01	01	-	-	01	01	-	-
TT	25	12	10	23	28	09	10	23

Quadro 2 - Linfoma de Hodgkin (LH); tipos e relação com o EBV (LMP,EBER) no Ceará,São Paulo,Rio de Janeiro e França; n= n° de casos; % ; (% de casos com EBV)

Região/tipos/n°/idade	CM	EN	DL
Ceará (1996) n=34c	23; 67% (100%)	8; 30% (50%)	1;3% (100%)
Ceará (1998) n=50ac	29;58% (89,2%)	18; 37%(44,4%)	3;6% (33%)
Ceará (2002) n=37a	11;30%(100%)	23; 62% (50%)	1;3% (100)
SP-Br (2001) n=1044ac	20% (...)	69% (...)	5% (...)
-RJ-Br (2001) n=64ac	5;8% (88)	35; 55% (40%)	7;11% (57%)
-França (1999) n=66 a	5;7,5% (80%)	55; 83% (18,2%)	4; 6% (0)

Obs: c = crianças e jovens (até 18 anos) a = adultos (acima dos 18anos)

5 DISCUSSÃO

Crescente é o interesse na relação do EBV com o LH, resultando em grande número de estudos de diferentes populações e localizações geográficas, sendo, porém, bastante reduzido o número de trabalhos comparando tipos de populações de países diferentes do mundo ou de um mesmo país.

Em países em desenvolvimento os estudos mostram uma relação mais próxima entre o vírus EBV e o Linfoma de Hodgkin que entre países desenvolvidos. Contudo não encontramos na literatura referência a análises comparativas sistematizadas da forma clássica do LH no adulto, sobretudo no Brasil com outros países. Pesquisamos a associação do EBV com o Linfoma de Hodgkin em pacientes provenientes de um país industrializado representado pela França e em pacientes de um país em desenvolvimento representado pelo Brasil, cujos estudos ainda são escassos, sobretudo levando-se em consideração sua grande variedade geográfica e étnica.

a) *Sexo x Idade x EBV*

Nos 118 casos fenotipados como LHc referentes a variável sexo houve predomínio do sexo feminino com 57,5% nos casos do Brasil contrariamente aos estudos de Ferreira et al., 1977 onde estudando uma amostra de 120 pacientes de Fortaleza- Ceará- Brasil com LH dando ênfase a incidência etária específica, incidência por sexo, distribuição e predomínio dos tipos histológicos encontraram predominância do sexo masculino, sendo esse predomínio acentuado em crianças e menos acentuado nas demais faixas etárias. Pitombeira et al., 1987 também identificaram maioria de sexo masculino (3: 1) em grupo de 105 pacientes infanto-juvenis sendo a maioria dos casos do Ceará. Os resultados da França mostraram predomínio do sexo masculino com 66,6% dos casos.

A abrangência em estudos anteriores ao nosso incluindo casos de todas as faixas etárias nos impede de avaliar o motivo da mudança relacionada ao sexo dos casos fenotipados como LHc. Não podemos afirmar que a exclusão em nosso estudo dos casos infanto-juvenis e infantis tenha sido responsável pela mudança do perfil referente à variável

sexo nos casos do Brasil, não podendo, porém, descartar tal assertiva ficando, porém, uma incógnita.

Nos casos pesquisados quanto a presença do EBV houve distribuição equivalente de positividade relacionada ao sexo nos casos do Brasil diferentemente dos casos da França que mostraram alta positividade (aproximadamente 80%) nos casos do sexo masculino.

Abreu (1996) não encontrou diferença significativa da presença do EBV ligada ao sexo em pacientes infanto- juvenis do estado do Ceará.

Leite (1998) estudando LH em grupo infanto–juvenil e adulto de Fortaleza-Ce-Brasil mostrou uma distribuição equivalente com relação ao predomínio de sexo, ou seja, resultado não concordante (FERREIRA, et al.,1977; PITOMBEIRA, 1987).

De acordo com a literatura Armstrong et al. (1993) encontraram uma tendência à presença do vírus em pacientes do sexo masculino sem contudo haver significância. Tomita, et al. (1996) estudando mais de 100 pacientes japoneses com idade média de 47 anos encontrou predomínio do sexo masculino com percentual de 76% contra 34% do sexo feminino. Segundo esses autores o fator influenciador poderia estar associado aos hormônios afetando a susceptibilidade ao EBV.

No nosso estudo a média de idade levando em consideração os dois países e representada por pacientes fenotipados como LHc foi de 41,0 anos, sendo de 30,0 e 37,0 anos para o sexo masculino do Brasil e França respectivamente e de 32,1 e 29,7 anos para as mulheres do Brasil e da França.

b) Subtipos Histológicos

O subtipo histológico mais freqüente na França foi o LHEN com 82,6 % em concordância com a literatura e com uma freqüência similar à observada nos países industrializados (SLIVNICK; NAWROCKI; FISCHE, 1989). No nosso estudo a relativa incidência dos subtipos de LH no Brasil mostrou-se distinta daquelas descritas para os países em vias de desenvolvimento (HUMME; ANAGNOSTOPOULOS; DALLENBACH, et al,

1992) havendo um maior número para o subtipo LHEN com 57,5 % na forma clássica do adulto em relação a forma LHCM (37,8%) que é referida como o subtipo freqüente em países em desenvolvimento; que pode significar uma mudança no perfil epidemiológico às custas de um programa de saúde preventiva mais eficaz.

Diversos estudos confirmam que o LHCM é o mais freqüente no terceiro mundo Chang et al. (1993), Gad; Elmawla et al. (1983) e Levi (1988). Ferreira et al. (1977) encontraram predominância do subtipo LHCM em casos do Estado do Ceará em todas as faixas etárias porém com maior freqüência no adulto. Posteriormente Pitombeira et al., (1987); Kirchoff et al (1980); Broecker Neto et al. (1986) descreveram o LHCM como o mais freqüente no Brasil com ênfase em estudos feitos no Ceará, São Paulo e Rio Grande do Sul.

Trabalho realizado na Bahia obteve resultado semelhante ao nosso, mostrando predomínio do LHEN em 68% dos casos em 1987 e 56% dos casos em 1992 (BITTENCOURT, et al., 1987; BITTENCOURT & BARBOSA, 1992).

Estudo realizado abordando a deleção de 30 pares de base de casos de LH nos Estados Unidos e Brasil mostrou como subtipo histológico predominante LHEN (65%) nos Estados Unidos e LHCM (85%) no Brasil Kazuhiko et al (1997). Estes achados reforçam a idéia de que o Linfoma de Hodgkin no Brasil tenha um perfil morfológico semelhante nas diferentes regiões. Seria recomendável, portanto, ampliar estes para um número maior de localidades.

Trabalho realizado na República Thecka relata a predominância do subtipo LHEN com 43,6 % do total (MACAK, et al, 2000).

Encontramos o subtipo LHCM como o segundo subtipo mais freqüente correspondendo a 37,8% dos casos no Brasil e apenas 11,6% para a França, com idade média de 35,5 e 38,8 anos respectivamente.

O subtipo LHDL foi representado somente por 01 caso do Brasil correspondendo a uma amostra muito reduzida para maiores considerações.

b) *Análise Imunohistoquímica dos marcadores linfóides.*

A interpretação dos resultados concentra-se no fato da inespecificidade dos anticorpos utilizados, tornando-se necessário o estudo em conjunto dos antígenos na forma de painel.

Todos os casos da nossa amostra foram analisados quanto à expressão dos antígenos CD 15, CD30 e CD 20, correspondendo ao padrão de marcadores linfóides para LHc descrito na literatura (POPPEMA, 1992; SAID 1992).

O CD 15 comumente positivo para células RS na maioria dos casos de LHc apresentou uma positividade de 87,8% no Brasil e 75% na França. Tal antígeno representa aqueles relacionados aos estágios tardios da granulopoesse, não significando, porém, origem do LHc de granulócitos. A sua positividade é proporcional ao número de granulócitos neutrófilos e eosinófilos de fundo. Nossos resultados são concordantes com aqueles encontrados por Oliveira et al, 2002 onde encontraram 86% de positividade para CD15 no grupo adulto do Ceará, sendo 92% no grupo adulto do estado de São Paulo. Dados da literatura reportam uma variabilidade consistente na expressão do CD 15 (CHITAL; CAVERIVIERE; SCHWART; VON WASIELEWWSKI., et al. 1997) correlacionaram um prognóstico desfavorável, caracterizado por recidivas mais frequentes nos casos de LH CD15 negativos.

A positividade para o CD 30 é de extrema importância para o diagnóstico de LHc. Nosso estudo utilizando o anticorpo BerH2 mostrou 100% de positividade para os casos do Brasil igualmente aquele resultado encontrado por Oliveira,2002 para os casos adultos do Ceará e 92% de positividade para o grupo adulto de São Paulo. Os casos da França também foram 100% CD30 positivos.

Convém ressaltar que outras patologias podem resultar em positividade para o CD30 como o LNH-T anaplásico, LNH-T cutâneo (SAID, 1992). A negatividade para o CD30 em caso clássico de LH onde se verificam células atípicas com morfologia semelhante a células RS e suas variantes em fundo celular apropriado e história clínica compatível com

tal pode ser justificado por perda de antigenicidade do material pesquisado ou mesmo erro de técnica que pode ir desde o processamento macroscópico como a má fixação em formalina, fragmentação do material até a histotecnologia como alteração da temperatura da parafina ou passagens muito rápidas pela bateria formol-álcool-xilol.

Três casos (4,5%) do Brasil foram CD20 positivos, sendo esse resultado semelhante ao de outros autores (4,9%) (VON WASILIEWSKI, et al,1997). É descrito na literatura a positividade para CD 20 em células RS de casos de LHc, podendo chegar até 25% (CHU, et al, 2000). Em tais casos usualmente somente um grupo de células RS são positivas ocorrendo variação na intensidade.

Vassalo, et al, (2002) referem que a expressão de CD20 e a variação em sua expressão pode ser devido a detalhes técnicos como procedimentos de fixação diferentes, anticorpos e método de recuperação antigênica usada. Relatam ainda que a atribuição a inconstante imunexpressão do fenótipo de célula B em LHc antes associada a grande ativação de marcadores de células não só B como também células T pelo EBV, não foi comprovada pelo seu estudo. A presença de um imunofenótipo CD20 positivo em LHc pode causar dificuldade no diagnóstico diferencial com linfoma não-Hodgkin de grandes células B, especialmente nos casos que expressam CD15 negativo. A questão pela qual CD20 não é expresso na maioria dos casos LHc ainda espera uma resposta convincente.

Foi realizado CD 45RO em todas as amostras com resultado negativo. Este antígeno geralmente não é expresso na forma clássica do LH, estando desta maneira consistente com os dados da literatura. Resultados semelhantes foram verificados em casuística anterior com pacientes infanto-juvenil do Estado do Ceará (ABREU, et al, 1997).

d) Linfoma de Hodgkin e a sua associação com o EBV.

d.1) Resultados gerais

LMP1 é uma proteína da membrana integral codificada pelo gen BNLF1 do EBV e é expressa na célula RS multinucleada do LH associado ao EBV quando submetida a IHQ. Em termos percentuais acima de 50% das células neoplásicas no LH apresenta positividade

em padrão paranuclear e membranar. O padrão membranar pode ser justificado pela sua presença em abundância na periferia celular associada à vimentina, o que pode ser necessário para sua manifestação fenotípica (CLAVIEZ, et al.: 1994; WEISS, et al., 1991b; ZHOU, et al., 1993; COATES, et al., 1991; VASEF, et al., 1995; KNECHT, et al., 1993; CHANG, et al., 1993; MURRAY, et al., 1992). O LPM é útil para o estudo do LH, porém não de outros tumores onde a sua expressão é reprimida.

Dentre suas características apresenta-se como um oncogene viral clássico capaz de transformação celular quando transferido para fibroblastos em ratos (WANG et al., 1985). Em linfócitos B é capaz de ativar vários gens celulares, incluindo o bcl-2 inibidor de apoptose. O efeito transformador do LMP1 tem uma alta expressão nas células RS do LH associado ao EBV indicando que essa proteína tem um papel importante na patogênese deste.

Casos de LH negativos para LMP1 não significam necessariamente não estarem infectados pelo vírus, haja vista haver sensibilidade de 80% de acordo com a literatura. A pesquisa viral pode ser coincidente com momento de concentração abaixo do nível de detecção, desnaturação antiênica, sensibilidade do método, diferentes cepas de LMP e não ligação com a vimentina podem levar a resultado negativo pela IHQ (DEL SOL, et al., 1992; PALLESEN et al. 1991). LMP1 é significativamente alterado pela fixação conseqüentemente a detecção do EBV não pode ser avaliada baseada somente na IHQ com o anticorpo anti-LMP1. Embora o uso do anticorpo anti-LMP1 seja tecnicamente simples para identificar EBV associada a LH, HIS com sonda EBER parece ser o método mais sensível para isso.

Em nosso estudo encontramos uma positividade total para o LMP₁ de 67,5% nos casos do Brasil e de 30,3% nos casos da França.

A eficiência do uso do EBER se deve ao fato de sua expressão elevada na latência, não havendo o risco de negatividade pela pesquisa feita num momento não crítico da doença. Outro fator de importância é a ausência de hibridização de maneira cruzada com outros vírus.

Casos EBER negativo não necessariamente indicam ausência viral podendo corresponder a perda do epissoma viral, tumor inicialmente negativo para EBV e só depois infectado e variação na expressão de genes (AMBINDER e MANN, 1994). Falhas na fixação

do material podem, também, ser fruto da ausência de EBER citoplasmática, pois alguns autores encontraram traços de positividade citoplasmática que por vezes pode ser representado por uma quantidade tão diminuta a ponto de ser imperceptível pela HIS. Esse dado é muito importante na avaliação da especificidade da HIS (WU et al,1990).

O padrão de positividade alcançado pela reação de Hibridização *in situ* é muito importante, pois indica sua especificidade havendo necessidade de ser observada positividade difusa, poupando os nucléolos em todas as células neoplásicas. Alguns pequenos linfócitos de fundo também podem demonstrar positividade. Artefatos de fixação podem ser frutos da ausência de EBER citoplasmática, pois alguns autores encontraram traços de positividade citoplasmática que por vezes pode ser representado por uma quantidade tão diminuta a ponto de ser imperceptível pela HIS. Esse dado é muito importante na avaliação da especificidade da HIS (WU et al,1990).

Nossos resultados da HIS foram concordantes com outros trabalhos associados a diferentes localizações geográficas. Nos casos do Brasil a positividade para o EBER foi de 75,6% ultrapassando consideravelmente os exibidos pelos países do Primeiro Mundo e se equiparando aos dos países do Terceiro Mundo anteriormente estudados (PRECIATO, et al.,1995; CHANG, et al., 1993; GULLEY, et al., 1994) sendo inferior aquele encontrado por Abreu,1996 que correspondia a 85,29% e maior que o valor encontrado por Leite, 1998 que foi de 70%. A França apresentou positividade para o EBV de 30,3% igualmente ao resultado de LMP1.

Kazuhiko, et al. (1997) através de IHQ e HIS de casos do Brasil e EUA encontraram positividade para o EBV de 46% nos Estados Unidos e 96% no Brasil.

Nos nossos casos do Brasil, três foram negativos para o LMP e positivos para o EBER, revelando ótima correlação entre os dois métodos. Essa correlação é positiva e classicamente descrita na literatura. (BROUSSET, et al., 1993b; HERBST, et al., 1991; DELSOL, et al., 1992; KANAVAROS, et al., 1994), sendo os outros assim como todos os casos da França concordantes para os resultados IHQ e HIS.

d.2.) Correlação com subtipos histológicos.

A positividade para o LMP1 mais elevada correspondeu ao subtipo LHCM onde no Brasil é de 72,7% contra 100% da França nesse subtipo histológico. Esses dados referentes ao maior índice de associação do subtipo LHCM ao EBV foi relatado anteriormente sendo concordante com resultados referentes ao trabalho comparando França e Argélia onde a positividade para o LHCM total foi de 61%. Em nosso trabalho a pequena casuística do subtipo LHCM nos casos da França (04 casos) não pode contribuir para uma melhor avaliação nesse sentido.

Uma sensível alteração no resultado percentual a cerca do subtipo LHCM ocorreu após submissão a HIS, onde a positividade passou para 90,9% para o Brasil continuando os mesmos 100% para a França. No mesmo trabalho citado referente à comparação entre França e Argélia essa diferença também é observada passando de 61% do LHCM para 80%.

O LHEN apresentou positividade para LMP1 de 65,2% para o Brasil e 20,6% para a França. Após HIS o resultado dos casos do Brasil foi para 69,5% permanecendo o mesmo resultado para a França.

Abreu (1996) em casos infanto-juvenis do Brasil encontrou o subtipo mais freqüentemente associado ao EBV o subtipo LHCM (100%). A maior incidência desses casos diferentemente do nosso trabalho onde encontramos uma maior presença do subtipo LHEN pode ser a justificativa para uma redução no resultado de 85,29% para os 75,6% por nós encontrados.

Leite (1998) verificou a presença do EBV sendo mais evidente no grupo infantil e subtipo LHCM com 89,28% de positividade.

Estudos realizados na República Tcheco, enfatizando a associação do LH com o EBV encontraram positividade maior para o subtipo LHCM (38%) sendo, porém, menor que a encontrada por nós para os casos do Brasil (90,9%) e da França (100%). Tal trabalho apresenta uma boa casuística da forma LHCM. Possivelmente os dados dos pacientes da

República Theco, em relação ao EBV e ao subtipo LHCM esteja bem mais próximo da realidade do que o verificado por nós em virtude da pouca representatividade da nossa amostra nos pacientes franceses (04 casos).

Estudo realizado na Turquia demonstrou o subtipo LHEN como o mais freqüente com positividade total para o EBV de 40%. (DURMAZ; AYDIN; KÖROGLU, et al,1992). Na China estudos com LH pediátrico mostrou uma maioria de casos do subtipo LHCM e positividade total para o EBV 89%(ZHOU XG et al,2001). Estudos em Tarragona na Espanha mostraram percentual mais alto porém não significativo da presença viral no subtipo LHCM (40,8%) (BOSH; ALVARO; BALANZA, et al, 2000).

O LHCM mostra-se altamente associado ao EBV em todo o mundo, seja em pacientes adultos ou em crianças, nos EUA, Honduras, Dinamarca, Japão ou China (AMBINDER, et al., 1993; KHAN, et al., 1993; WEINREB, et al., 1992; FELLBAUM et al., 1992; WEISS et al, 1991b, TOMITA, et al., 1996, ZHOU, et al., 1993) .

A incidência do EBV no LH é maior nos países de Terceiro Mundo como oslatino-americanos tipo Peru, Argentina e Honduras (PRECIATO et al., 1995; CHANG et al., 1993; Gulley et al., 1994). Afora ser bastante associada ao EBV, o LHCM tem uma evolução bastante desfavorável. Os escassos estudos disponíveis a esse respeito são consistentes em afirmar a existência de uma correlação direta entre a presença do EBV e prognóstico (DELSOL et al.: 1992; FELLBAUM et al.: 1992; CLAVIEZ et al.: 1994; KANAVAROS et al.: 1993).

Armstrong et al. (1993) encontraram positividade de 72% para o EBER em 25 casos de LH no estado de São Paulo. Estes dados, associados aos nossos fortalecem a hipótese de uma maior associação entre nós do papel do vírus EBV na patogênese do LH.

e) Técnicas utilizadas para a pesquisa do EBV

Em verdade o método ideal para a detecção do EBV deve combinar sensibilidade, simplicidade e possibilidade de localização do EBV a nível celular. Os métodos de Imunohistoquímica (IHQ) e Hibridização *in situ* (HIS) apresentam esses requisitos e ainda a

facilidade de execução em material estocado em bloco de parafina, o que não é possível com outros métodos como o Southern Blot e PCR que exigem tecido congelado. A HIS tem sido usada em tecido armazenado em bloco de parafina por mais de 20 anos o que o torna uma técnica de grande utilidade para pesquisas e material com problemas de preservação. Parte da nossa amostra consta de material obtido de blocos de parafina do ano de 1999.

Uma alta sensibilidade para o EBV foi vista em análise por PCR quando comparada com outros estudos havendo nesse a desvantagem de superestimar a presença de EBV ampliando o DNA de células não patogênicas havendo a necessidade de um controle morfológico (VASSALLO J. et al., 1993).

Belkaid et al, 1995 comparando pacientes com LH da França e Argélia utilizando HIS, IHQ e PCR encontraram positividade nos três tipos, sendo o genoma viral detectado em 92% dos casos. A quase totalidade de positividade para essas amostras pode ser interpretado pelo fato do vírus está quase sempre nas células RS e o método ser então o mais sensível entre os utilizados ou pelo fato do genoma viral encontrado ser proveniente tanto das células linfóides vizinhas às células RS quanto delas próprias. Dessa forma torna-se então preferível o uso de uma técnica mais específica como a IHQ e HIS também por ele utilizadas.

Outros autores como Delsol, et al., (1992) concordam que sempre que possível as duas técnicas, HIS e IHQ, devem ser feitas em conjunto para reduzir os problemas técnicos e a variação na expressão do LMP. Convém lembrar que PCR e *Southern blot* são baseados em extratos teciduais, como citado anteriormente não permitindo a identificação da fonte de positividade podendo levar a um resultado errôneo.

Em síntese a utilização dos métodos de IHQ (LMP) e Hibridização in situ (EBER) são satisfatórios, na pesquisa do envolvimento viral em LH.

f) Correlação dos métodos de HIS e HIS

Em nossa amostra de casos do Brasil de 38 casos positivos para o EBER apenas três foram negativos para LMP1 o que comprova a existência de uma boa correlação entre os

dois métodos, portanto aumentando a confiabilidade principalmente na HIS por ser um método mais específico.

Os casos LMP1 positivos e EBER negativos provavelmente foram devido a má fixação do material ou a baixa concentração antigênica.

Nossos achados reforçam a hipótese de que o EBV estaria mais implicado na patogênese do LH Clássico do adulto em casos brasileiros que franceses. Pode-se inferir que esta maior associação entre nós tenha uma mais precoce e maior carga viral na infância e adolescência. Além disso, outros fatores podem estar envolvidos como área geográfica, raça, sexo além de possíveis cofatores. Portanto a aplicação das técnicas de HIS (EBER₁ RNA) e Imunohistoquímica para a detecção da proteína LMP₁ no nosso trabalho, realizado em tecido fixado em formol e incluído em parafina poderá ser um instrumento valioso para futuros estudos epidemiológicos da associação do vírus EBV no LH em maior número de casos com outras regiões do Brasil.

g) Considerações finais

Nossos achados reforçam a hipótese de que o EBV estaria mais implicado na patogênese do LHc do adulto em casos brasileiros que em franceses. Pode-se inferir que esta maior associação entre nós tenha uma mais precoce e maior carga viral na infância e adolescência. Além disso, outros fatores podem estar envolvidos como área geográfica, raça, sexo além de possíveis cofatores. Portanto a aplicação das técnicas de HIS (EBER₁RNA) e Imunohistoquímica para a detecção da proteína LMP₁ no nosso trabalho, realizado em tecido fixado em formol e incluído em parafina poderá ser um instrumento valioso para estudos epidemiológicos da associação do vírus EBV no LH em maior número casos com outras regiões do Brasil.

6 CONCLUSÃO

A nossa busca maior no decorrer do trabalho foi a de fazer uma avaliação nos índices de associação do Linfoma de Hodgkin clássico no adulto com o EBV e avaliar a existência de uma variação nesse índice de acordo com a condição sócio-econômica envolvendo duas populações de nível econômico opostos. Dessa forma nossa maior conclusão foi a participação do EBV no desenvolvimento do LH no adulto em ambos os países sendo, porém, maior no Brasil que na França. O subtipo mais positivo para o EBV foi o LHCM com positividade de 72,7% no Brasil e 100% na França. Tal diferença pode ser associada em parte a uma maior casuística de casos de LHCM no Ceará que na França. Fatores concomitantes como pobreza, más condições sanitárias, alimentação deficiente levando a desnutrição, doenças como a malária; todos sabidamente associados a alterações no sistema imunológico já foram apontados como um dos responsáveis pela variação dessa associação, embora já existam evidências de que o sistema imunológico não desempenhe um papel determinante na associação viral com exceção dos casos extremos onde ocorre associação com o EBV tipo 2.

O EBV não pode ser considerado o único responsável pelo desenvolvimento do LH havendo também a participação de herança genética de algumas populações. Gulley, et al. (1994) em seu trabalho sobre LH encontraram a presença do EBV em 59% dos pacientes hispânicos, enquanto no grupo não hispânico o vírus foi detectado em apenas 23% dos casos, demonstrando que o fator racial também tem importância na etiopatogênese do LH.

A questão da participação do sistema imunológico na gênese do LH ligado ao EBV é por vezes questionável devido ausência do genoma de outros vírus, que constituiriam infecção oportunista nos casos avaliados e pelos métodos utilizados.

Considerando o exposto acima e os objetivos que nos levaram a realizar nossa pesquisa os resultados permitem as seguintes conclusões:

1. Relacionado ao subtipo histológico existe uma predominância nos casos do Ceará – Brasil do LHEN (57,5%)

2. O subtipo Celularidade Mista foi o que apresentou maior relação para o EBV em ambos os países sendo de 90,9% no Brasil e 100% na França, seguido do subtipo LHEN correspondendo a 69,5% no Brasil e 20,6% na França.
3. A média de idade para o subtipo predominante (EN) no Brasil é mais baixa que na França respectivamente 28,9 e 34,1 anos.
4. Houve predominância do sexo feminino no Brasil
5. Que os métodos de estudo por nós utilizados como IHQ e HIS são de grande valia no estudo presente e futuro da pesquisa viral em LH, sendo inclusive equivalentes, de alta sensibilidade e específicos na detecção do EBV em casos de LH.
6. A associação global do Linfoma de Hodgkin Clássico do adulto com o EBV foi encontrado em nossos estudos em 75,6% dos casos do Brasil e 30,3% dos casos da França
7. O perfil imunohistoquímico dos casos do Brasil e da França foram característicos daqueles descritos, para a forma clássica de LH com o CD 30+, CD15+ e CD 20-. Em três casos brasileiros tivemos CD 20+.

Concluindo, gostaríamos de ressaltar que um dos grandes achados de nosso trabalho encontra-se na mudança de subtipo histológico apresentada na região nordeste do Brasil, mais precisamente no Ceará. A que se deve tal assertiva? Melhora das condições econômicas e nível social da população? Será que o melhor acesso da população a assistência médica e o conhecimento de medidas profiláticas como imunizações foram responsáveis por essa mudança do subtipo de LHCM descrito alguns anos atrás para o LHEN de melhor prognóstico?

Fica aqui a incógnita e continua o grande enigma a respeito da apresentação do LH e sua distribuição nas diferentes regiões geográficas do mundo, sendo um vasto campo de pesquisa para aqueles que guardam consigo grande interesse pela ciência.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E.S.; FERREIRA, FVA; ROCHA FILHO, FD et al. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no Estado do Ceará e sua relação com o vírus de Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica, imunohistoquímica e por hibridização *in situ*. **J. Bras.Patol**; 33(4):178-84, out-dez.1997.ilus, tab.
- ABREU, E. S. Doença de Hodgkin infanto-juvenil do Estado do Ceará e sua relação com o vírus de Epstein- Barr: parâmetros clínicos, análises morfológica, imuno-histoquímica e por hibridização *in situ*. Fortaleza, 1996. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará.
- ADDIS, B. J., ISAACSON, P.G. Large cell lymphoma of the mediastinum: a B- cell tumor of propable thymic origin. **Histopathology**, v. 10, p. 379-90, 1986.
- AGNARSSON B.A.,KADIN M.E: The immunephenotype of Reed- Sterneberg cells. A study of 50 cases of Hodgkin's disease using fixed frozen tissue. **Cancer** 63:2083-2087,1989.
- AMBINDER, RF,BROWNING PJ, LORENZANA I et al. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and United States. **Blood**, v.81, p.462-7, 1993.
- AMBINDER, RF., MANN, R.B. Epstein-Barr encoded RNA in situ hybridization: diagnostic applications. **Hum. Pathol.**, v.25, p.602-5, 1994.
- ANAGNOSTOPOULOS I., HANSMANN M.L., FRANSILA K. et al. European task force on lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and imunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. **Blood**, 1996: 1889-1899.
- ARAÚJO, I; FOSS HD; BITTENCOURT A. et al. Expression of Epstein-Barr virus gene products in Burkitt's Lymphoma in Northeast Brazil. **Blood**, vol 87,n^o 12 (June 15), pp 5279-5286, 1996.
- ARBER D.A.; WEISS LM: CD 15: A review. **Appl Imunohistochem**, 1:17-30, 1993.
- ASHTON-KEY M., THORPE P.A., ALLEN J.P.,ISAACSON P.G. Follicular Hodgkin's disease. **Am J. Surg. Pathol**, 19: 1294-1299.
- ARMSTRONG AA, ALEXANDER FE, PAES RP et al. Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, 142:1683-1688, 1993.
- BABCOCK GJ, DECKER LL, VOLK M., et al. EBV persistence in memory B cells in vivo. **Immunity** 9: 395-404, 1998.
- BACCHI, C. E. et al. Linfoma do sistema nervoso central: associação com o vírus Epstein-Barr. **Jornal Brasileiro de Patologia**. (submetido a publicação em 15/05/96).

_____ AIDS- related lymphoma in Brazil. **Am J Clin Pathol.**, v.105,p.230-7, 1996.

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

BARGU R.C., EMMERICH F. KRAPPMAN D, BOMMERTK et al. Constitutive nuclear factor-kappa B-Rel A activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. **J. Clin. Invest.** 100: 2961-2969, 1997.

BEARMAN RM, PANGALIS GARAPPAPORT H. Hodgkin's disease lymphocyte depletion type. A clinicopathologic study of 39 patients. **Cancer**, 41: 293-302, 1978.

BELKAID M.I. F. ZERHOUNI, K BELJORD, J BRIÈRE ;W ASSOUAK; Z DJEBBARA; JM ANDRIEU, P COLONNA. Association du virus d'Epstein- Barr à la maladie de Hodgkin : comparaison entre patients algériens et français, **Bull Cancer**, 82, 357- 363, 1995.

BOYLE MJ et al. Subtypes of Epstein-Barr virus (EBV) in Hodgkin's disease: association between B-type EBV and immunocompromise. **Blood**, v.81, p.468-74, 1993.

BORING CC, SQUIRES TS, TONG T. Cancer statistics.1993. **Ca Cancer J Clin.**, 43 :7-26, 1993.

BOSH PA, ALVARO NT, BALANZA RR, SALVADO UMT, MARTINEZ GS, CONTRERAS BE. Hodgkin's disease. Etiopathogenic role of Epstein-Barr virus in Tarragona. **Med Clin (Barc)**, 2000 Mar 25;114(11):411-3.

BRÄUNINGER ,A ,HANSMANN M. L.,STRICKLER, J.G. et al. **Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non- Hodgkin's Lymphoma**. Massachusetts Medical Society, 1999.

BROUSSET P.; CHITAL S.; SCHLAIFER D. et al. Detection of Epstein-Barr virus messenger RNA in Reed- Sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with biotinylated probes on socially processed modified acetone methyl benzoate xylene (ModAMex) sections. **Blood**, 77:1781-6, 1991.

BROUSSET P; ROCHAIX P; CHITTAL S et al. High incidence of Epstein-Barr virus detection in Hodgkin's disease and absence of detection in anaplastic large cell lymphoma in children. **Histopathology**, 23:189-91, 1993.

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

BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in African children. **Br J Surg** 46:218, 1958.

CARBONE A, GLOGHINI A, ZANETTE I et al. Co- expression of Epstein-Barr virus latent membran protein and vimentin in "agressive" histological subtypes of Hodgkin's disease. **Virchow's Arch A Pathol Anat Histopathol**, 422:39-45, 1993.

CARTWRIGHT RA;ALEXANDER FE; MCKINNEY PA; RICKETTS RJ. Hodgkin's disease. In Cartwright RA (ed): Leukaemia and lymphoma. Na Atlas of distribution within areas of England and Wales 1984-88. **London: Leukaemia research fund** 1990;80-9.

CHAN JKC. The New World Health Organization Classification of Lymphomas: The past, the present and future. Review Article. **Hematol Oncol**, 19: 129-150, 2001.

CHANG, KL; ALBUJAR PF;CHEN YY,JOHNSON RM,WEISS LM.: High prevalence of Epstein- Barr virus in the Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. **Blood**. v. 81, p. 4966-501, 1993.

_____,ARBER DA,WEISS LM : CD 30: a review. **Appl Imunohistochem**, 1:244-55, 1993.

CHITAL 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** 12: 9-12, 1988.

CHU PG, CHANG KL, ARBER DA, WEISS LM.Immunophenotyping of Hematopoietic Neoplasms. **Seminars in Diagnostic Pathology**, Vol 17, n. 3 (August), 2000: pp 236-256.

CLAVIEZ, A . et al. The impact of EBV, proliferation rate, and bcl-2 expression in Hodgkin's disease in childhood. **Ann Hematol**.,v.68, p.61-6, 1994.

COATES, P.J., SLAVIN, G. D' ARDENE **Ann. Hematol**, A.J. Persistence of Epstein-Barr virus in Reed Sternberg cells throughout the course of Hodgkin's disease. **J. Pathol.**, v.164, 291-7, 1991.

DELSOL G, BROUSSET P., CHITTAL S, RIGAL- HUGUET F. Correlation of the expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP) and in situ hibridization with biotinylated Bam HI W probe in Hodgkin's disease. **Am J Pathol**, 140:247-53, 1992.

DeVITA,V. & ULTMANN. Doença de Hodgkin e os linfomas kinfocíticos. In: BRAUNWALD, E. et al. **Harrison Medicina Interna**, 11.ed, Guanabara, v.22, cap 294, 1988.

DIRNHOFER S.; ANGELES-ANGELES A.; ORTIZ-HIDALGO C. et al. High prevalence of a 30-base pair deletion in the Epstein-Barr virus (EBV) Latent Membrane Protein 1 gene and strain type B EBV in Mexican Classical Hodgkin's disease and reactive lymphoid tissue. **Human Pathology**,vol.30, n.7 (July 1999).

DURMAZ R, AYDIN A, KÖROGLU M, AKER H, OZERCAN IH, ATIK E, ARICI S. Detection and genotyping of Epstein -Barr virus by polymerase chain reaction in tissues obtained from cases with Hodgkin's disease in Turkey. **Acta Virol**, 42(6): 375-81, 1998.

ELIOPOULOS AG; DAVIES C;BLAKE SS; MURRAY P; NAJAFIPOUR S; TSICHLIS PN; YOUNG LS. The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1- induced NF-kappab signaling downstream of TRAF2. **J Virol**;76 (9): 45677-79, 2002.

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

EPSTEIN, MA; ACHONG, BG., BARR, YM: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **Lancet**, v.II, p.702-3, 1964.

FELLBAUM C, HANSMANN ML, NIEDERMEYER H et al. Influence of Epstein-Barr virus genomes on patient survival in Hodgkin's disease. **Am J Pathol.**, 98:319-23, 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.

FERRY, JA et al. Hodgkin's disease, nodular sclerosis type. **Cancer**, v.71, p.457-63,1993.

FONES-TAN,A. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IgA and IgG antibodies to Epstein-Barr virus ribonucleotide reductase in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Int. J. Cancer**, v.59, p.739-42,1994.

GAO, S.J. et al. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. **N. Engl. J.Med.**, v.335,p.233-41, 1996.

GAD-EL-MAWLA, N. et al. Pediatric Hodgkin's disease in Egypt. **Cancer**, v.52, p.1129-31, 1983.

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

GROGAN TM,BERARD CW,STEINHORN SC, et al. Changing patterns of Hodgkin's disease at autopsy: a 25-year experience at the National Cancer Institute,1953-1978. **Cancer Treat Rep.**, 66:653-65, 1982.

GULLEY,ML. Et al. Epstein-Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and hispanic american ethnicity. **Blood**, v.83, p.1595-1602, 1994.

GUNTHEL, C.J. et al. Association of Epstein-Barr virus types 1 and 2 with adquired immunodeficiency syndrome- related primary central nervous system lymphomas. **Blood**, v.83, p.618-9, 1994.

HALL P.A., DÁRDENE A .J, STANSFELD A .G.: Paraffin section imunohistochemistry. 1. Non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology** 13:149-160, 1988.

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

HARRIS, N. L. et al. A revised European- American classification of lymphoid neoplasm: a proposal from the international lymphoma study group. **Blood**, v. 84, p. 1361- 1392, 1994.

HAYASHI,K; GANG-WEN , C; CHEN, YAN-YAN et al. Deletion of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Gene in United States and Brazilian Hodgkin's disease and Reactive Lymphoid Tissue: high frequency of a 30 bp deletion. Departments of Pathology, City of Hope National Medical Center, Duarte, CA; UNESP and UNICAMP, São Paulo, Brazil, vol. 28, no 12 (December 1997).

HENDERSON S, ROWE M, GREGORY C, CROOM- CARTR D, WANG F, LONGNECKER R, KIEFF E, RICKINSON A: Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programming cell death. **Cell** 65:1107, 1991.

HENLE G, HENLE W: The virus as the etiologic agent infectious mononucleosis, in Epstein MA, Achong BG (eds): Epstein-Barr Virus, Berlin Germany Springer – Verlag, 1979, p. 257.

HERDIER , B. G.; KAPLAN, L. D.; MCGRATH, M. S. **Pathogenesis of AIDS lymphomas.** v.8, p. 1025-49: 1994.

HUMMEL,M. et al. Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells. **N. Engl. J. Med.**,v.33, p.901-6, 1995.

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: 689-94, 1992.

HUH J PARK C, JUHNG S, KIM CE,POPPEMA S, KIM C. A Pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with the Epstein-Barr virus infection. **Cancer** 77: 949-955, 1996.

IARC Working Group: Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8, IARC monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 70. Lyon, France, IARC, 1997.

JAFFE ES,HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW. Pathology and genetics tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. World Organization Classification of Tumors. Hodgkin's lymphoma IARC Press ; Lyon, 2001. Chapt. 8, p.239-53.

JANDL, J. H. **Blood: textbook of hematology.** 2.ed.: Little Brown, 1996. Cap. 27, p. 1099-1135.

JARRET RF, MACKENZIE J. Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin disease. **Semin. Hematol**, 36:260-269, 1999.

JOHANSSON B, KLEIN G, HENLE W, HENLE G. Epstein –Barr virus(EBV)- associated antibody patterns in malignant lymphoma and leukaemia I. Hodgkin's disease. **Int. J. Cancer**, 6:450-452, 1970.

KANT J.A .,HERBBARD S.M, LONGO D.L. et al. The pathologic and clinical heterogeneity of lymphocyte- depleted Hodgkin's disease. **J. Clin.Oncol** 4: 284-294, 1986.

KHAN G, MIYASHITA EM, YANG B et al: Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 5:173-179, 1996.

KHANNA, R et al. **Immune regulation in Epstein-Barr virus- associated diseases.** *Microbiol. Reviews* .p387-405, 1995.

KIEFF.E. Epstein-Barr virus increasin evidence of a link to carcinoma. *N.Eng. J.Med.*, v.333, p.724-6, 1996.

_____ : Epstein-Barr virus and is replication, in Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds): *Fields Virology*, vol 2(ed 3). Philadelphia PA, Lippincoultt- Raven, 1996,pp 2343-2396.

KINGMA DW et al. Epstein -Barr virus is infrequently identified in non- Hodgkin's lymphomas associated with Hodgkin's disease. *Am J surg Pathol.*, V.18, P. 48-61, 1994.

KRIPALANI- JOSHI, S., LAW, HI. Identification of integrated Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma using pulse field gel electrophoresis. *Int. J. Cancer*, v.56, p. 187-92, 1994.

LABREQUE,L.G. et al. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors : a breast cancer study. *Cancer Res.*,v.55,p.39-45, 1995.

LEI KI, CHAN WY, JONHSON PJ, LO YM. Circulating cell-free Epstein-Barr vírus DNA levels in patients with EBV- associated lymphoid malignancies. *Ann N Y Acad Sci*; 945:80-3, 2001 Sep.

LEITE, L. P. **Estudo analítico da associação da doença de Hodgkin com o vírus de Epstein-Barr em uma região tropical.** Fortaleza, Ceará-Brasil. Comparação com dados oriundos de pesquisas em regiões com distintos níveis de desenvolvimento social e econômico. Fortaleza: (Mestrado em Patologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, 1998.

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

LEVINE, P.H. et al. Elevated antibody titers to Epstein virus in Hodgkin's disease. *Cancer*, v.27,p.416-421, 1971.

LIEBOWITZ, D,KIEFF,E . Epstein-Barr virus. In: ROIZMAN, B.; WHITLEY, RJ, LOPEZ, C. **The human herpesviruses.** New York: Raven Press, 1993, cap.4, p. 107-172.

LISTER, TA, CROWTHER D, SUTELIFFE SB et al. Report of a commitee convened to discuss the evaluation and staining of patients with Hodgkin's Disease: Costwoolds Meeting. *J. Clin. Oncol.*, v. 17, p. 1630-1636, 1989.

LUKES RJ., BUTLER J.J. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1966;266: 1063-83.

MACK TM, COZEN W, SHIBATA DK, et al. Concordance for Hodgkin disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl. J Med* 332:413-418, 1995.

MACMAHON B. Epidemiological of Hodgkin's disease. **Cancer**, 10:1045-54, 1957.

MACFARLANE GJ; EVSTIFEEVA T; BOYLE P; GRUFFERMAN S. international patterns in the occurrence of Hodgkin's disease in children na young adult males. **Int J Cancer**, 61:1655-9, 1995.

MATHEW, A. et al. A high incidence of serum IgG antibodies to the Epstein-Barr virus replication activator protein in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer. Immunol Immunother.**, v.38, p.68-70, 1994.

MEDEIROS L.J., WEISS L.M., WARNKE R.A.: Utility of combing antigranulocyte with antileukocyte antibodies in differentiating Hodgkin's disease from non- Hodgkin's lymphoma. **Cancer** 62:2475-2481, 1988.

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.

MUELLER N.; EVANS A.; HARRIS NL. COMSTOCK, GN; JELLUM E.; MAGNUS, K et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus: Altered antibody pattern before diagnosis. **N. Engl. J. Med.** 1989: 320: 689-695.

MURRAY PG, YOUNG LS, ROWE M and Crocker J(1992). Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. **J Pathol** 166:1-5.

NALESKI, MA et al. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-Prednisone Immunossupression. **Am J Pathol.**, v.133,p.173-92, 1988.

NEIMAN RS, ROSEN PJ, LUKES RJ. Lymphocyte- depletion Hodgkin's disease. A clinicopathological entity. **N Engl J Med.**, 288: 751-5, 1973.

OLD , LJ et al. Precipitating antibody in human serum to na antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.56, p.1699-704, 1966.

OLIVEIRA D.E ,BACCHI M.M , ABREU E.S et al. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geografic regions in Brazil. **Am J Clin Pathol** 2002, 118:25-30.

PALLESEN G, SANDVEJ K, HAMILTON-DUTOIT SJ, ROWE M, YOUNG LS. Activacion of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed Sternberg cells. **Blood**, 78:1162-5, 1991.

PALLESEN G, HAMILTON-DUTOIT SJ, et al.Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. **Lancet** 337:320-322, 1991.

PATHMANATHAN, R. et al. Clonal proliferations of cells infected with Epostein-Barr virus preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. **N.Engl.J.Med.** v.333,p.693-8, 1995.

PERKIN DM;MUIR CS; WHELAN SL. Cancer Incidence in five continents. V. VI. IARC Scientific Publications N^o 120. **Lyon: International Agency for research on Cancer**, 1992.

PEH SC, LOOI LM, PALLESEN G: Epstein-Barr virus (EBV) and Hodgkin's disease in a multi-ethnic population in Malasya. **Histopathology** 30:227-233, 1997.

PICKER L.J., BRENNER M.B., MICHIE S: Expression of T-cell receptor delta chains in benign and alignant T lineage lymphoproliferation. **Am J Pathol** 132: 401-405, 1988.

PINKUS G.S.,THOMAS P, SAID J.W.: Leu-M1- A marker for Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. An imunoperoxidase study of paraffin- embedded tissues. **Am J Pathol** 119:244-252, 1985.

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, p.2577-64, 1992.

PRECIADO, MV, De MATTEO E,DIEZ B, MENARGUEZ J, GRINSTEIN S.Presence of Epstein –Barr vírus aaand strain type assignment in Argentine childhood Hodgkin's disease. **Blood**, vol 86, n 10, pp 3922-3929, (November 15), 1995.

PURTILO DT, SAKAMOTO K, SAEMUNDSEN AK: Documentation of Epstein-Barr virus infection in immunodeficient patients with life threatening lymphoproliferative disease by clinical, virological and immunopathological studies. **Cancer Res** 41: 4226, 1981.

RAZZOUK, BI et al. Epstein-Barr virus in pediatric Hodgkin disease: age and histiotype are more predictive than geographic region. **Med Pediatr. Oncol.**, v.28.,p. 248-254, 1997.

REE H.J., NEIMAN R.S. MARTIN A.W: Paraffin section markers for Reed- Sternberg cells. A comparative study of peanut agglutinin, Leu-M1, LN2, and Ber H2. **Cancer** 63:2030-2036, 1989.

RICKINSON AB, KIEFF : Epstein-Barr virus, in Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds): **Fields Virology**, vol 2 (ed 3). Philadelphia, PA, Lippincott-Raven, 1996, pp2397-2446.

RIES LAG; MILLER BA;HANKEY BF. SEER Cancer statistics review, 1973-1991: Tables and graphs. **NIH Publication** N^o 94-2789.Bethesda,MD: National Cancer Institute 1994.

ROINZMAN, B., WHITLEY, R.J.; LOPEZ, C. Preface. In: ROINZMAN, B., WHITLEY, R.J, LOPEZ,C. **The human herpesviruses**. New York: Raven Press, 1993. P.IX.

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

SHEIBANI K, BATTIFORA H, RAPPAPORT H: Leu- M1 antigen in human neoplasms. An immunohistologic study of 400 cases. **Am J Surg Pathol** 18: 528-530, 1994.

SCHMID C, PAN L, DISS T, et al: Expression of B-cell antigen by Hodgkin's disease and Reed- Sternberg cells. **Am J. Pathol** 129:434-440, 1991.

SCHOEPPPEL SL, HOPPE RT, DORFMAN RF, et al. Hodgkin's disease in homosexual men with generalized lymphadenopathy. **Ann Intern Med.**, 102:68-70, 1985.

SCHOOLEY,RT. Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis). In: MANDELL,GL., BENNET,JE., DOLI, R. **Principles and practice of infectious diseases**. New York: Churchill Livingstone, v.2, cap. 118, p.1364-77, 1995.

SLIVNICK DJ, NAWROCKI JF, FISCHER RI. Immunology and cellular biology of Hodgkin's disease. **Hematol/Oncol Clin N Amer.**, 3:205-20, 1989.

SUNDEN, J. et al. Rearranged antigen receptor genes in Hodgkin's disease. **Blood**. v.70, p.96-103, 1987.

STEIN, H. Hodgkin's disease. In: Proposed World Organization classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 21,n.1,p.119-121, 1997.

STRAUSS, SE. Herpes B virus. In: MANDELL, G.L., BENNETT,J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious disease**. New York: Churchill Livingstone, v.2 cap.120, p.1379-82, 1995.

TARR K, GLASER R: The Epstein-Barr virus and the nasopharyngeal carcinoma. **Microb Pathol.**, 7:11, 1989.

TILLY H, BASTARD C,DELASTRE T et al. Cytogenetic studies in untreated Hodgkin's disease. **Blood**, 77:1298-304, 1991.

TIRELI V. ERRANTE D., DOLCETTI R. GLOGHINI A . et al. Hodgkin's disease and human immunodeficiency virus infection: clinicopathologic and virologic features of 114 patients from the Italian Cooperative Group on AIDS and tumors. **J Clin Oncol** 13: 1758-1767.

ULTMANN JE, MORAN EM. Clinical course and complications in Hodgkin's disease. **Arch Intern Med.**, 131:332-53, 1973.

VASSALO J, BROUSSET P, KNECHT H, LAMANT L, ODERMATT BF, DELSOL G. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. **Appl Immunohistochem** 1(3): 213-219, 1993.

VASSALLO J, METZE K, TRAINA F et al. Further remarks on the expression of CD20 in classical Hodgkin's lymphomas. **Haematologica** 2002; 87: (03) ELT17.

ZOU XZ, SANDVEJ K, LI PJ, JI XL, YAN QH, ZHANG XP, DA JP, HAMILTON-DUTOIT SJ. Epstein-Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV- related lymphoma. **Cancer** 2001 Sep 15;92(6):1621-31.

ZARATE-OSORNO A, ROMAN LN, KINGMA DW ,MENESES-GARCIA A, JAFFE ES. Hodgkin's disease in Mexico. Prevalence of Epstein- Barr virus sequences and correlations with histological subtype. **Cancer**, 75:1360-6, 1995.

WEINREB M, DAY PJR, MURRAY PG et al. Epstein-Barr virus(EBV) and Hodgkin's disease in children: Incidence of EBV latent membrane protein in malignant cells. **J Pathol.**, 168:365-9, 1992.

WEISS, L.M.; CHEN Y. Y.; LIU X. F., CHIBATA D. Epstein- Barr virus and Hodgkin's disease: a correlative in situ hibridization and polymerase chain reaction study. **Am. J. Pathol** v. 139, p.1259-65, 1991.

WEISS LM, MOVAHED LA, WARNKE RA, et al. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease. **N Engl J Med** 320:502-506, 1989.

WEISS,L.M., STRICKLER JG, WARNKE RA et al. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v. 129, p.86-91, 1987.

WRIGHT, C. F. et al. Detection of Epstein-Barr virus sequences in Hodgkin's disease by the polymerase chain reaction. **Am. J. Pathol.**, v. 139, p. 393-398, 1991.

WU, T-C et al. Fatal Epstein virus-associated lymphoproliferative disorder in childhood. **Arch. Pathol. Lab. Méd.**, v.119, p.409-471, 1995.

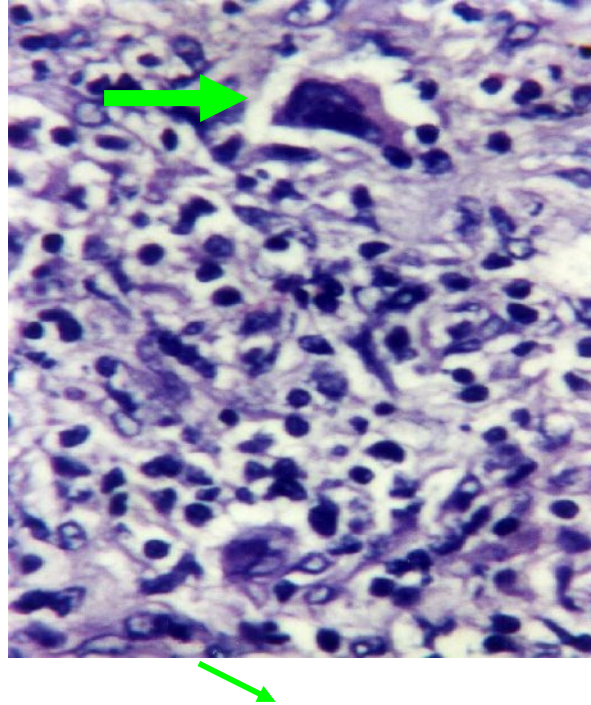
ANEXOS 1: FIGURAS

FIGURA 3: Linfoma de Hodgkin, subtipo Celularidade Mista. (HE). Cél. RS (seta). Aumento de 200X .Caso 27.

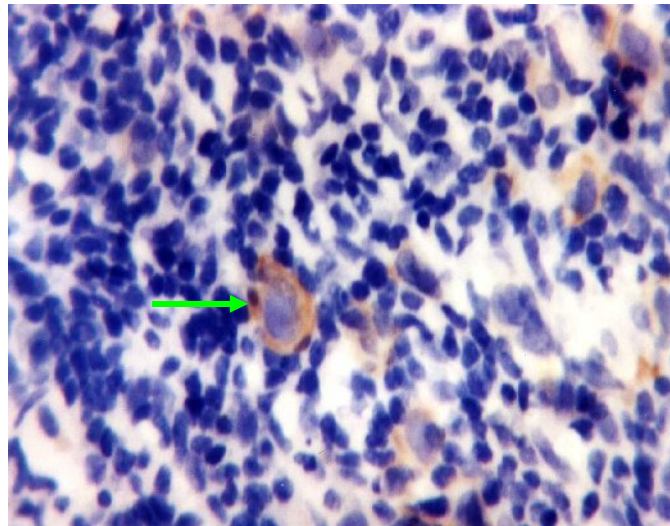


FIGURA 4: Linfoma de Hodgkin, subtipo Esclerose Nodular. CD30. Cel. RS positiva(seta). Aumento de 200X .Caso 15.

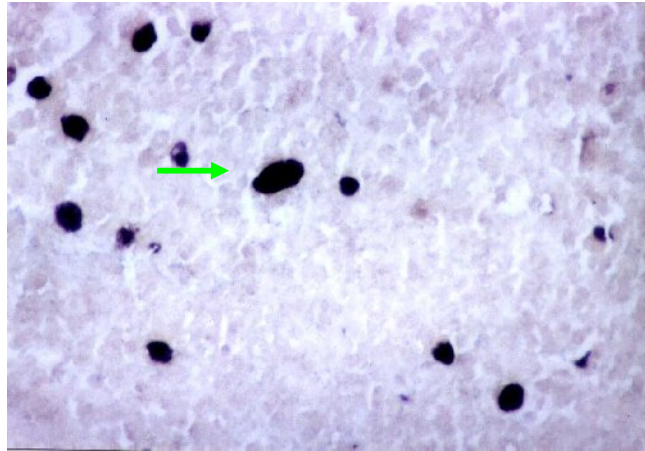


FIGURA 5: Linfoma de Hodgkin, subtipo Esclerose Nodular.). HIS. Céls. RS positivas (seta). Aumento de 200X. Caso 15.

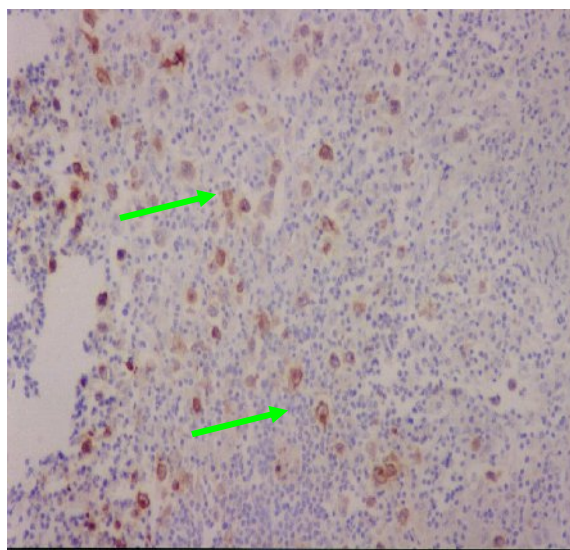


FIGURA 6: Linfoma de Hodgkin, subtipo Esclerose Nodular. IHQ. Céls RS positivas (setas). Aumento de 200X. Caso 15.

**ANEXO 2: TÉCNICA DA REAÇÃO DE
IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) MÉTODO DE
AVIDINA-BIOTINA**

01. Desparafinar e hidratar
02. Colocar as lâminas num recipiente de plástico com tampão citrato (PH 6,0).
03. Colocar as lâminas no microondas.
04. Deixar as lâminas no tampão citrato -20 min. Temperatura ambiente.
05. Lavar em TBS – 5 min.
06. Bloqueio da Peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% em metanol – 10 min.
07. Lavar em TBS- 5 min.
08. Incubação em câmara úmida no soro normal de coelho (1:5)- 20 min. Após incubação retirar o excesso de soro sobre as lâminas (aspiração).
09. Incubação em câmara úmida, no anticorpo primário diluído de acordo com o protocolo. Over-night a 8^o.
10. Lavar em TBS- 5 min.
11. Incubação em câmara úmida, no anticorpo secundário (coelho anti- mouse biotinilado) diluído 1:200. 30 min.
12. Lavar em TBS- 5 min.
13. Incubação em câmara úmida, no complexo ABC. 30 min.
14. Lavar em TBS. 5 min.
15. Revelação em diaminobenzidina (DAB). 7 min. Adicionar 10 microlitros de H₂O₂ no momento do uso.
16. Lavar em água corrente.
17. Contrastar com hematoxilina . 30 seg.
18. Desidratar e montar em bálsamo.

ANEXO 3: TÉCNICA DA REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* (HIS)

1) Desparafinização e hidratação

Xilol 2x	15 minutos cada
Álcool absoluto 3x	1 minuto cada
Água corrente.....	lavagem
Água destilada	lavagem

2) Recuperação antigênica

Microondas (tampão citrato PH 6,0) aproximadamente por 6-7 minutos

3) Esperar a solução esfriar.....20 minutos.

4) Água destilada.....lavagem

5) Bloqueio (Peróxido/Metanol 3%).....20 minutos.

6) Água corrente.....lavagem

7) Água destilada

8) Digestão enzimática (opcional)

Proteinase K (1:10.000)..... 5 minutos.

9) TBS ou PBS (2x).....5 minutos.

10) Secar ao ar.

11) Desnaturação e Hibridização

Sonda HPV/ DNA – Colocar a sonda sobre o tecido e cobrir com a lamínula, levar à placa aquecedora a 93-95 ° 5 minutos.

12) Esfriar rapidamente

13) Estufa a 37 ° (calibrada) overnight

14) Remover a lamínula em tampão à temperatura ambiente.....5 minutos.

15) Lavagem “ stringent” 1:50 / H₂O₂ pré- aquecida (frasco 2).

Incubar a 55 ° C por 20 minutos.

16) TBS por cinco minutos.

17) Amplificação de sinal

Incubar com Strepto- ABC 1: 500 em tampão diluente a 37 ° C por 15 minutos.

18) TBS (3x)

19) Incubar com Biotinil- Tiramida. 37 ° C (1 gota).....15 minutos.

- 20) TBS (3x)
- 21) Incubar Strepto- Peroxidase 37⁰ C15 minutos.
- 22) TBS (3x).....5 minutos
- 23) Revelação DAB- H₂O₂
- 24) Água destilada5 minutos.
- 25) Contra-coloração
Hematoxilina.....1 minuto
- 26) Lavar em água corrente
- 27) Desidratar e montar em álcool e xilol.