

R 907570
02/12/98

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

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.

LINDOMAGNO PESSOA LEITE

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso
de Pós-Graduação em Patologia do
Departamento de Patologia e Medicina Legal
da Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Dr. Francisco Valdeci de Almeida Ferreira

Fortaleza

1998

D
616.99446
L5542
1998

**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.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Patologia.

Data da Aprovação: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisco Valdeci de Almeida
Ferreira
(Orientador)

Prof. Dr. Eilson Goes de Oliveira

Prof. Dr. Antônio Wilson Vasconcelos

**Ao Criador e mantenedor da
vida, dedico este trabalho
singelo.**

“ Sem simplicidade e sem integridade de caráter não há percepção profunda do mistério da criação.”

(Jonh Burroughs - Filósofo naturalista)

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 A Doença de Hodgkin	13
1.2 O vírus de Epstein-Barr (EBV).....	24
1.2.1 Associação do EBV com diferentes patologias.....	27
1.3 Associação da DH com o EBV	29
2 OBJETIVOS.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4 RESULTADOS.....	42
4.1. Grupo da doença de Hodgkin	42
4.1.1 Sexo e idade.....	42
4.1.2 Análise histológica da amostra e localização anatômica dos linfonodos	43
4.2 Grupo de referência.....	43
4.3 Detecção do EBV nas amostras estudadas.....	44
4.4. Comparação entre a associação da DH e EBV nos grupos infanto-juvenil e adulto no Ceará	45
4.5 Associação do EBV com os subtipos da DH.....	46
4.6 Associação entre EBV e desenvolvimento.....	47
5 DISCUSSÃO	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	58
7 ANEXOS.....	61
8 SUMMARY	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE SIGLAS

ABC:	Complexo avidina-biotina-peroxidase
CD:	Cluster of designation.
CNF:	Carcinoma nasofaríngeo.
DAB	Diaminobenzidina.
DH:	Doença de Hodgkin
DHCM:	Doença de Hodgkin, subtipo celularidade mista.
DHCRL:	Doença de Hodgkin clássica rica em linfócitos
DHEN:	Doença de Hodgkin, subtipo esclerose nodular
DHPL:	Doença de Hodgkin, subtipo predominância linfocitária.
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
EA:	Early antigens.
EBER:	Epstein –Barr encoded RNA
EBNA:	Epstein-Barr nuclear antigen.
EBV:	Vírus de Epstein-Barr
EUA:	Estados Unidos da América.
HE:	Hematoxilina-eosina
HIS:	Hibridização <i>in situ</i>
IDH:	Índice de desenvolvimento humano.
Ig:	Imunoglobulina.
IHQ:	Imunohistoquímica.
IL:	Interleucina.
LAGC:	Linfoma anaplásico de grandes células.
LH :	Linfocítica e histiocítica
LHCM:	Linfoma de Hodgkin, subtipo celularidade mista.
LHCRL:	Linfoma de Hodgkin clássica rica em linfócitos.
LHEN:	Linfoma de Hodgkin, subtipo esclerose nodular.
LHPL:	Linfoma de Hodgkin, subtipo predominância linfocitária.
LMHLAGC:	Linfoma maligno com características de linfoma de Hodgkin e linfoma anaplásico de grandes células.
LMP:	Latent membran protein
MI:	Mononucleose infecciosa.
NK:	Natural killer.
OMS:	Organização Mundial da Saúde.
PCR:	Polimerase chain reaction
REAL:	Revised European American Classification of Lymphoid Neoplasma

RNA: Ácido ribonucléico
RS: Reed –Sternberg
UFC: Universidade Federal do Ceará

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Doença de Hodgkin: subtipo celularidade mista. Caso 36. Pág. 61
- Figura 2:** Doença de Hodgkin: subtipo depleção linfocitária. Caso 35. Pág. 62
- Figura 3:** Doença de Hodgkin: subtipo esclerose nodular. Caso 49. Pág. 63
- Gráfico 1:** Correlação entre positividade para o EBV e IDH, no subtipo DHCM, de acordo com dados de regiões com diferentes condições econômicas. Pág. 48
- Gráfico 2:** Correlação entre positividade para o EBV e IDH, no subtipo DHEN, de acordo com dados de regiões com diferentes condições econômicas. Pág. 49

RESUMO

A associação da Doença de Hodgkin (DH) com o vírus de Epstein-Barr (EBV) tem sido observada em um número substancial de casos, com presença do DNA viral exclusivamente nas células de Reed-Sternberg (RS). Neste trabalho, foi realizado um estudo analítico de uma amostra, contendo 50 casos da DH no Ceará, dividida em dois grupos : infanto-juvenil (< 18 anos) e adulto (>18 anos). Procurou-se evidenciar, através do Teste do Qui-quadrado, a possível relação do EBV com cada grupo etário, bem como a sua associação com os subtipos histológicos.

A fim de estabelecer uma correlação entre desenvolvimento e positividade para o EBV em áreas com diferenças geográficas e econômicas, foram coletados dados de pesquisadores de 15 diferentes regiões do planeta, sendo os mesmos submetidos a um estudo de correlação, através do coeficiente de Spearman. O grau de desenvolvimento de cada região arrolada no estudo foi avaliado por um indicador sócio-econômico denominado Índice de Desenvolvimento Humano (IDH).

Os resultados sugerem uma forte associação do EBV com a DH no Ceará, mais evidente no grupo infanto-juvenil e no subtipo Celularidade Mista. Além do mais, demonstra a existência de uma relação inversamente proporcional entre desenvolvimento sócio-econômico e presença do EBV.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Hodgkin (DH)

A Doença de Hodgkin é uma neoplasia linfóide (Haluska, 1994; Hummel et al., 1995; Stein, 1997) sólida que se origina, normalmente, em um linfonodo isolado ou numa cadeia de linfonodos e que pode, eventualmente, se disseminar por via linfática, comprometendo linfonodos contíguos. Ela representa a neoplasia maligna mais comum entre os adultos jovens (Gutensohn & Cole, 1980), sendo que na Europa ocidental e nos Estados Unidos da América ela responde por 20% a 45% de todas os linfomas malignos (Huh et al., 1996).

Esse linfoma difere dos outros por várias razões. Primeiro, ele se caracteriza morfológicamente pela presença de uma célula neoplásica gigante denominada célula de Reed-Sternberg (RS), que é essencial para o diagnóstico histológico, embora não seja exclusiva da doença, como veremos adiante. Uma segunda característica desta neoplasia refere-se à sua composição celular. Observa-se que as células RS e suas variantes constituem uma pequena parcela da população tumoral, aproximadamente 1 a 2% (Banks, 1995; Sundeen et al., 1987), enquanto nos chamados linfomas não-Hodgkin o tipo celular que caracteriza a doença é predominante e com frequência subverte a arquitetura normal do linfonodo. Clinicamente, a DH distingue-se por apresentar sintomatologia sistêmica, como a febre e sudorese. Finalmente, este linfoma tem prognóstico favorável na maioria dos pacientes, evoluindo para cura em aproximadamente 75% dos casos, enquanto os linfomas não-Hodgkin são frequentemente fatais (Jandl, 1996).

É importante ressaltar que apesar da doença de Hodgkin comportar-se como uma neoplasia, existem dúvidas se de fato ela é. A favor desta tese está a sua forma de crescimento sem controle, com invasão de órgãos vitais e resposta satisfatória apenas às drogas tumorocidas.

Contrariamente, os vários subtipos histológicos e a dificuldade em se verificar o fenótipo e determinar a clonagem das células de Reed-Sternberg põem em dúvida o seu carácter neoplásico.

Historicamente, os linfomas foram pela primeira vez descritos em 1832 por Thomas Hodgkin. No seu clássico trabalho “On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen”, o médico inglês demonstrou pela primeira vez o comprometimento maligno primário de linfonodos, criando assim uma nova categoria de doença.

Em 1846, Virchow diferenciou os linfomas das leucemias e em 1865 Samuel Wilks designou esta nova classe de patologia como doença de Hodgkin, reconhecendo a importância da descrição feita inicialmente por Thomas Hodgkin.

A primeira descrição microscópica da doença de Hodgkin foi feita em 1872 por Langhans. Posteriormente, o patologista austríaco Carl Sternberg, em 1898, e a médica americana Dorothy Reed, em 1902, reconheceram a importância da presença de uma célula gigante para o diagnóstico da doença, denominada posteriormente de célula de Reed-Sternberg.

O aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico conseguido neste século, através da imunohistoquímica e da biologia molecular, tem proporcionado grandes avanços na compreensão da DH que se refletiram em sucesso no tratamento, garantindo cura na maioria dos casos (Jandl, 1996).

Na DH os linfonodos costumam apresentar-se com uma obliteração total ou parcial de sua arquitetura, decorrente da presença de um infiltrado composto por linfócitos, histiócitos, eosinófilos, plasmócitos e neutrófilos. As células de Reed-Sternberg estão presentes em pequena ou grande quantidade (caracterizemó-las adiante). A classificação histopatológica da DH fundamenta-se, principalmente, na diferença da composição do infiltrado celular, particularmente no que diz respeito à variação do número de linfócitos e histiócitos presentes no mesmo.

O primeiro sistema de classificação para a DH foi proposto por Jackson e Parker, em 1947, e distinguia três subtipos: sarcoma, paragranuloma e granuloma, este último mais freqüente. Em 1966, Lukes, Butler e Hicks propuseram uma subclassificação que se correlacionava com a evolução clínica dos pacientes. Este linfoma foi, então, dividido nas formas linfocítica e histiocítica (nodular ou difusa), esclerose nodular, celularidade mista e fibrose difusa e reticular (Banks, 1995). Posteriormente, Lukes et al., *Apud* Eyre, 1993, a partir de um simpósio internacional ocorrido na cidade de Rye, em Nova Iorque, postularam uma classificação mais simplificada, utilizada até os dias de hoje. De acordo com a classificação de Rye, existem quatro subtipos histológicos : Esclerose Nodular (DHEN); Predominância Linfocitária (DHPL), que englobou as formas linfocítica e histiocítica nodular e difusa; Celularidade Mista (DHCM) e Depleção Linfocitária (DHDL), que envolveu as antigas formas reticular e difusa.

Em 1994, o “ International Lymphoma Study Group” publicou uma nova classificação para DH conhecida como “Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasma (REAL)”. A classificação REAL transformou o DHPL, variante difusa, em uma entidade histológica distinta denominada Doença de Hodgkin Clássica rica em Linfócitos e agrupou os Linfomas Anaplásicos de Grandes Células (LAGC) na categoria de Linfomas de Células T periféricos, recebendo a denominação de LAGC semelhante à DH (Harris et al., 1994).

Atualmente, encontra-se em elaboração pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma nova classificação para a DH. Nesta nova proposta, os LAGC são reunidos no grupo da DH, devido a recentes pesquisas que mostraram de forma convincente a sua íntima relação com o mesmo, recebendo a denominação de Linfoma Maligno com Características de Linfoma de Hodgkin e LAGC, que substituiu o subtipo anterior DHDL. Uma outra modificação que está sendo introduzida por esta proposta é a sugestão para a especificação na descrição do DHPL de áreas mais ou menos difusas, como uma forma de evitar confusão com o diagnóstico de DH Clássica Rica em Linfócitos (Stein,1997).

O comitê da OMS responsável pelo desenvolvimento desta classificação propõem ainda a mudança do nome doença de Hodgkin para Linfoma de Hodgkin, uma vez que os últimos

trabalhos sobre a natureza das células de Reed-Sternberg apontam para uma origem linfóide (Stein, 1997).

Tabela 1. Evolução da Classificação Histopatológica da Doença de Hodgkin*

Jackson - Parker (1946)	Lukes – Butler (1966)	Classificação de Rye - (1966)	Classificação REAL - (1994)	Proposição da OMS (199_)
Paragranuloma	Linf./histiocítico	DHPL	DHPL	LHPL(+/- difuso) LHClássico LHCRL
Granuloma	1. Nodular	1. Nodular	DHCRL	LHEN (graus I e II)
	2. Difuso	2. Difuso		
	Esclerose nodular	DHEN	DHEN	LHCM
	Misto	DHCM	DHCM	
Sarcoma	Fibrose difusa	DHDL	DHDL	LMHLAGC
	Reticular			

*Nota 1: Adaptação ampliada da tabela existente em DeVita & Ultmann, 1988.

2: A proposição da OMS, ainda não concluída, depende de um acordo final de seus comitês.

Legenda: DHPL : Doença de Hodgkin subtipo Predominância Linfocitária; DHEN : Doença de Hodgkin subtipo Esclerose Nodular; DHCM : Doença de Hodgkin subtipo Celularidade Mista; DHDL : Doença de Hodgkin subtipo Depleção Linfocitária; DHCRL : Doença de Hodgkin Clássica Rica em Linfócitos; LHPL : Linfoma de Hodgkin subtipo Predominância Linfocitária ; LHCRL: Linfoma de Hodgkin Clássico Rico em Linfócitos; LHEN : Linfoma de Hodgkin subtipo Esclerose Nodular; LHCM : Linfoma de Hodgkin subtipo Celularidade Mista; LMHLAGC : Linfoma Maligno com características de Linfoma de Hodgkin e Linfoma Anaplásico de Grandes Células. REAL: Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasma

A seguir, caracterizaremos os diversos subtipos histológicos da DH, de acordo com a classificação REAL (Harris et al, 1994), porque ela, além de englobar a classificação de Rye, apresenta informações mais atualizadas.

O subtipo histológico da DH denominado Predominância Linfocitária apresenta um padrão de crescimento nodular, com ou sem áreas difusas. Raramente será observado numa forma difusa pura. As células RS típicas são dificilmente encontradas. No seu lugar são observadas células atípicas, com núcleo polilobulado e nucléolo pequeno, denominadas células L&H (linfocítica e/ou histiocítica) ou células “popcorn”. No infiltrado é predominante a presença de linfócitos, com ou sem grupos de histiócitos epitelióides; os plasmócitos são infreqüentes e os eosinófilos e neutrófilos raros. Este subtipo apresenta peculiaridades únicas e está intimamente relacionado com o linfoma folicular de células B. A doença é mais freqüente em homens jovens, com menos de 35 anos (Contran et al., 1994), tendo excelente prognóstico, pois aproximadamente 70% dos pacientes encontram-se no estágio I (ver adiante sobre estadiamento da DH) por ocasião do diagnóstico (Hansmann *Apud* Banks, 1995). Este comportamento eminentemente benigno do DHPL explica-se por uma melhor resposta imunológica observada nestes pacientes, traduzida histologicamente pela grande quantidade de linfócitos e pela presença de rosetas (células-alvo envolvidas por linfócitos). De acordo com Ferreira & Menezes, 1977, existe correlação diretamente proporcional entre o número de rosetas, bem como o número de linfócitos em cada uma delas, e o prognóstico do subtipo histológico. O padrão imunohistoquímico das células atípicas é CD45+, CD20+, CD15-, CD30+/- . Normalmente, estas células são negativas para a presença do vírus de Epstein-Barr (EBV). Estas características, mais a presença de células atípicas foram decisivas para a distinção deste subtipo dos outros pertencentes ao chamado grupo clássico da DH, pois os subtipos que compõem este último, apresentam freqüentemente células RS típicas, presença de EBV (40% a 100% [Pallensen et al., 1991; Wright et al., 1991; Weinreb et al., 1996]) e, usualmente, o seguinte padrão imunohistoquímico: CD15+, CD30+, CD20- e CD45-.

O subtipo histológico Celularidade Mista é o mais comum nos países em desenvolvimento e o segundo mais freqüente nos países desenvolvidos. Morfologicamente, o infiltrado caracteriza-se por ser difuso, dificilmente nodular, sem faixas de esclerose, embora possa se encontrar fibrose intersticial discreta. As células RS típicas são abundantes, embora possam ser observadas também células lacunares. A heterogeneidade do infiltrado manifesta-se pela presença de eosinófilos, neutrófilos, plasmócitos e linfócitos (vide figura 1 – anexo). É encontrado

mais comumente em crianças e idosos, associado a estádios mais avançados, com sintomas constitucionais e imunodeficiência (Banks, 1995). A imunofenotipagem das células neoplásicas deste subtipo mostra o seguinte padrão: CD30+, CD15+/- e CD45 -. O EBV é encontrado na maioria das células RS (60% a 100% [Chang et al., 1993; Abreu, 1996; Weinreb et al., 1996]).

A forma menos comum da DH apresenta-se com escassez de linfócitos, recebendo a denominação de Depleção Linfocitária . O infiltrado é difuso e aparenta ser oligocelular em virtude da presença de fibrose e necrose difusas. As células RS e suas variantes pleomórficas “sarcomatosas” são relativamente abundantes, porém existe pobreza de células inflamatórias. Podem-se destacar dois padrões morfológicos : fibrose difusa e variante reticular. No primeiro, o linfonodo é oligocelular e repleto de material fibrilar proteináceo, onde se encontram histiócitos pleomórficos, células RS típicas e atípicas e alguns linfócitos. A variante reticular tem população celular maior, sendo composta por células anaplásicas grandes e pleomórficas que se assemelham às células RS. Nesta forma, poucas células RS típicas são observadas (vide figura 2 – anexo). É oportuno ressaltar que não existe um marco divisório claro entre a variante reticular e o LAGC e que, talvez, isto seja apenas um problema conceitual. A doença é mais comum nos homens idosos e as adenopatias periférica e mediastinal são muito menos freqüente neste grupo (Nieman *Apud* Banks, 1995). 81% dos casos encontram-se, no momento do diagnóstico, nos estádios III e IV (Contran et al., 1994), constituindo-se, desta forma, no subtipo de pior prognóstico. A relação do EBV com este subtipo é variável também, sendo que Wright et al., 1991 e Weinreb et al., 1996 encontraram o vírus em aproximadamente 50% dos casos que analisaram. A imunofenotipagem deste subtipo se mostra desta forma: CD30+, CD15+/- e CD45-.

O subtipo histológico Esclerose Nodular é o mais freqüente nos países desenvolvidos (40% a 70%) (Banks, 1995). Este tumor tem, pelo menos em parte, um padrão nodular, com faixas de fibrose separando os nódulos. A célula característica, como vimos anteriormente, é uma variante da célula RS, denominada célula lacunar. Pode-se, entretanto, encontrar células RS típicas durante o exame histológico (vide figura 3 – anexo). O infiltrado contém, ainda, linfócitos, histiócitos, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos. Este subtipo tem propensão a comprometer linfonodos cervicais baixos, supraclaviculares e mediastinais. A maioria dos pacientes é

adolescente ou adulto jovem do sexo feminino (Contran et al., 1994; Banks, 1995). Evoluem, normalmente, com prognóstico muito bom (60% dos pacientes encontram-se no estágio I ou II por ocasião do diagnóstico [Contran et al., 1994]). O padrão imunohistoquímico é CD15+/-, CD30+ e CD45-. Wright et al., 1991 e Peh et al., 1997 encontraram o EBV em 30% e 100% dos casos, respectivamente.

O último subtipo histológico a ser descrito é conhecido por DH Clássica Rica em Linfócitos . Este linfoma é definido como um tumor difuso, com poucas células RS típicas; algumas células lacunares podem ser vistas no fundo, com linfócitos. Eosinófilos e plasmócitos são poucos frequentes. Pode existir semelhança morfológica com os subtipos DHPL difuso, a fase celular da DHEN e DHCM. Diferente da forma DHPL difuso, as células RS têm padrão morfológico e imunohistoquímico clássicos, justificando a separação dos dois como entidades distintas. O padrão imunohistoquímico é similar aos dos subtipos DHEN e DHCM.

Tabela 2. Fenótipo dos subtipos histológicos da DH

Antígeno	DHEN	DHCM	DHDL	DHCRL	DHPL
LeuM1 (CD15)		positivo			negativo
Ki-1 (CD30)		positivo			negativo
LCA (CD45)		negativo			positivo
L26 (CD20)		posit./negat.			positivo
Cadeia J		negativo			positivo

As células de Reed-Sternberg são consideradas o elemento neoplásico essencial em todas as formas da DH, de maneira que a sua identificação é imprescindível para o diagnóstico histológico. A célula RS clássica é grande (15 a 45 µm de diâmetro), binucleada ou bilobulada, apresentando um nucléolo eosinofílico proeminente envolvido por um halo claro (aspecto de “olho- de- coruja”) (vide figura 2- anexo) . Algumas vezes existem vários núcleos, outras vezes o único núcleo é multilobulado e polipóide. Variantes mononucleares das células RS têm sido descritas e talvez representem células RS cortadas em um plano que evidenciou apenas um lobo

do núcleo (Banks, 1995). Uma variante conhecida como célula lacunar é característica do subtipo histológico DHEN. Ela é grande, apresenta um núcleo único, hiperlobulado, com nucleólos pequenos, múltiplos e um citoplasma pálido, com bordas bem definidas, havendo separação entre a sua membrana celular e as das demais células (vide figura 3- anexo).

As células RS não são patognomônicas da DH, pois podem ser observadas em algumas condições infecciosas, como a mononucleose infecciosa (MI), ou em neoplasias, como a micose fungóide, linfomas de células T, linfomas anaplásicos e em reação à drogas. Em nosso meio, Ferreira & Menezes, 1977, demonstraram em linfonodos de pacientes com leishmaniose visceral e tuberculose a presença de células com morfologia semelhante as células RS. Assim sendo, pode-se afirmar que as células RS são necessárias para o diagnóstico, porém não suficientes, devendo-se, a fim de confirmar o diagnóstico de DH, considerá-las em um contexto mais amplo, relacionando-as com as outras células do infiltrado (Contran et al., 1994).

A natureza das células RS tem sido objeto de intensa investigação. 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, estas células tiveram sua origem relacionada a diferentes tipos celulares, como macrófagos ou histiócitos, células reticulares dendríticas, células reticulares interdigitais ou granulócitos (Haluska et al., 1994). Pesquisas mais recentes, entretanto, baseadas nas técnicas de imunofenotipagem e biologia molecular, apoiam a tese de que as células RS originam-se de linfócitos B ou T (Weiss et al., 1987; Sundeen, 1987; Wright et al., 1991; Haluska, 1994; Hummel et al., 1995; Stein, 1997).

Segundo Stein *Apud* Haluska, 1994, 85% dos casos de DHCM e DHEN expressam o antígeno Ki - 1 (CD30). Este antígeno é expresso primariamente em linfócitos, podendo ser encontrado ocasionalmente em macrófagos. É conveniente lembrar que o CD30 pode ser observado também em outras patologias, como os linfomas de células T, a linfadenopatia angioimunoblástica, a papulose linfomatóide e o LALC.

Um outro antígeno geralmente encontrado nas células RS é o LeuM1 (CD15), marcador para granulócitos. O CD15, entretanto, não é restrito às células desta linhagem, pois pode ser também detectados em linfócitos T ativados, células infectadas por citomegalovírus e células não pertencentes à linhagem linfóide (Banks, 1995).

Com relação à expressão de marcadores específicos para linfócitos T, Haluska et al., 1994, relataram que em mais de 40% dos casos observa-se a presença de CD2, CD3 ou CD4, restritos aos subtipos DHEN e DHCM. Os autores afirmaram, entretanto, que outros pesquisadores encontraram estes marcadores também no subtipo DHDL.

Existe também nas células RS, apesar de menos freqüente, expressão de antígenos próprios de linfócitos B. Os marcadores CD19, CD20 e CD22, associados aos linfócitos B, são expressos numa fração pequena de casos quando se leva em conta todos os subtipos histológicos, porém em algumas séries eles são expressos na maioria dos casos. A expressão da cadeia J, antígeno específico de linfócitos B, foi detectado exclusivamente na DHPL. Este subtipo é normalmente positivo para CD 20, enquanto que nos demais subtipos apenas aproximadamente 50% dos casos são positivos. Daí considerar-se esta forma diferente das demais, tratando-se, provavelmente, de um linfoma de células B (Haluska, et al., 1994)

Vários outros antígenos , apesar de inespecíficos para a DH, podem ser expressos pelas células RS e suas variantes. É o caso do receptor para interleucina – 2 (IL-2) (CD25), do OKT9 (CD71-receptor para transferrina), do Ki-67, do marcador de proliferação celular e do antígeno leucocitário comum (CD45) (Haluska, et al., 1994).

A hipótese da origem linfóide para a DH encontra, conforme veremos adiante, suporte também nos estudos que utilizam a biologia molecular, a imunogenética e a citogenética, apesar das dificuldades impostas pela escassez de células neoplásicas.

Sundeen et al., 1987, demonstraram na linhagem celular L428, cultura de células que supostamente são descendentes de células RS, a ocorrência de imunoglobulina com rearranjos

gênicos na cadeia pesada, bem como nas frações κ e λ da cadeia leve, reforçando a hipótese de origem linfóide para as células RS. Além do mais, nestas células foi encontrado, também, β -receptores para linfócitos T.

O cariótipo da DH apresenta-se normalmente hiperplóide, sem alterações cromossômicas aberrantes ou defeitos específicos (Banks, 1995). Cabanalis *apud* Banks, 1995, identificou “pontos de quebra” (11q23, 14q32, 6q11-21 e 8q22-24) semelhantes aos observados em outros linfomas, reforçando a hipótese de origem linfóide para a DH. Ele relatou, também, a presença de translocação t(14;18) (q32, q21), típica de linfomas foliculares de células B. Esta translocação é responsável por uma super expressão de *bcl-2*, que, como se sabe, é um oncogene responsável pela inibição da apoptose celular (Contran, 1994). Por outro lado, tem sido descrito também alterações genéticas compatíveis com neoplasias malignas de linfócitos T, como a descrição da presença de rearranjos gênicos para receptores de células T (Eyre, 1993).

Resumindo e tentando dar uma possível explicação para o achado nas células RS de antígenos pertencentes a ambas as linhagens de linfócitos B e T, pode-se sugerir que estas células derivam de linfoblastos em diferentes estágios de maturação, antes ou durante o surgimento dos rearranjos gênicos que darão origem aos receptores de superfície, os quais propiciarão a diferenciação dos linfócitos (Eyre, 1993).

A apresentação clínica inicial mais freqüente na DH é a linfadenopatia cervical, quase totalmente assintomática (Eyre, 1993). Pode-se observar, no entanto, manifestações sistêmicas, como febre, sudorese noturna profusa e perda de peso superior a 10 % do peso corporal basal nos últimos 6 meses, que são denominados em seu conjunto de sintomas “B”. A etiologia destes sintomas permanece inexplicada, apesar dos esforços para elucidá-la. A constatação da presença dos mesmos é importante, pois se costuma relacioná-los com um pior prognóstico. A febre está presente em 27% dos pacientes no momento do diagnóstico e é, geralmente, baixa e irregular (Banks, 1995). Pode ser encontrado, ainda, prurido generalizado, acompanhado de escoriações, que raramente acontece na ausência de febre ou sudorese noturna, e é desprovido de significado prognóstico. Apesar destas serem as manifestações iniciais mais freqüentemente observadas, o

paciente com DH pode eventualmente apresentar como primeiro sinal um quadro mais grave, como a obstrução da veia cava superior ou compressão súbita da medula espinhal. Em aproximadamente 10% dos pacientes com DH existe referência de dor nos linfonodos comprometidos imediatamente após a ingestão de álcool, porém sem valor prognóstico (Jandl, 1996).

Com a finalidade de avaliar a extensão da DH e estabelecer um planejamento para o tratamento dos pacientes, tem-se, desde 1971, adotado um sistema de estadiamento, sendo que o mais utilizado atualmente é a Classificação de Cotswolds, 1989 (Eyre, 1993), que foi transcrita abaixo para uma melhor compreensão. Este estadiamento representou uma evolução da Classificação de Ann Arbor utilizada durante anos na orientação terapêutica dos doentes com DH.

Tabela 3. Classificação de “Cotswolds”

Estádio I:	Envolvimento de um linfonodo isolado ou uma estrutura linfóide (e.g., baço., Timo, anel de Waldeyer)
Estádio II:	Envolvimento de dois ou mais linfonodos no mesmo lado do diafragma (o mediastino é um sítio singular, linfonodos hilares são lateralizados). O número dos sítios anatômicos devem ser indicados por um sufixo (e.g., II ₃)
Estádio III:	Envolvimento de linfonodo ou de estruturas em ambos os lados do diafragma III ₁ com ou sem linfonodos do hilo esplênico, celiaco ou portal III ₂ com linfonodos para-aórtico, ilíaco e mesentérico
Estádio IV:	Envolvimento de sítio extranodal, designado por “E” A: sem sintomas B: febre, perda de peso e sudorese X: extensão da doença > 1/3 do diâmetro do mediastino > 10 cm de extensão máxima da massa nodal E : envolvimento de um sítio extra-nodal, contíguo ou próximo de um outro conhecido EC: estágio clínico EP : estágio patológico

1.2 O vírus de Epstein-Barr (EBV)

O EBV pertence a família *Herpesviridae*, sendo observado apenas na espécie humana, onde desperta grande interesse pelo fato de produzir infecções crônicas e induzir proliferação celular e câncer (Khanna et al., 1995; Kieff, 1996).

Semelhante a outros herpesvírus, o EBV tem o seu genoma envolvido por uma cápsula protéica icosaédrica (capsídeo), formada por 162 capsômeros. Mais externamente existe o envoltório viral, que é constituído por lipídios, proteínas e uma glicoproteína característica que o diferencia dos demais herpesvírus. Entre o nucleocapsídeo (genoma + capsídeo) e o envelope viral localiza-se o tegumento, composto de proteínas virais. As proteínas mais abundantes do envelope e do tegumento são, respectivamente, 350/220 e 152 kd, sendo que a primeira desempenha importante função na adsorção do vírus à célula hospedeira (Kieff, 1996).

O EBV foi o primeiro herpesvirus a ser completamente seqüenciado. O genoma do vírus é uma molécula linear de DNA, com dupla fita, de 172 kb, composta por 60% de guanina e citosina.

Os genes do EBV expressos durante a infecção latente e alguns durante a fase lítica não guardam semelhança com genes de outros herpesvírus, levantando a suspeita de que eles tenham sido incorporados ao genoma viral, a partir do genoma da célula hospedeira, ao longo de sua evolução. Em acordo com esta hipótese, pode-se citar que as seqüências repetidas GGGGCAGGA presentes no gene EBNA 1 (Epstein-Barr nuclear antigen 1) são também encontradas no DNA celular. 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 primeiro está intimamente relacionado com os genes *jun/fos*, que são ativadores da transcrição; o gene BHRF1 guarda alguma semelhança com o gene *bcl-2*, que regula a apoptose. O gene BCRF1 é o mais notável exemplo de aquisição de genes da célula hospedeira, pois é muito parecido com o gene que codifica a citocina IL 10, que, como se sabe,

tem efeito supressor sobre a resposta imunológica celular (Murray et al., 1992; Khanna et al., 1995; Kieff, 1996).

Existem dois tipos de EBVs designados por EBV-1 e EBV-2. Os genomas destes subtipos 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 EBNA5, 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 de membrana (LMP1 e 2) são mínimas e não apresentam significado biológico (Khanna et al., 1995; Kieff, 1996).

Sobre o potencial oncogênico do EBV, além daquele demonstrado pelos genes BZLF1, BHRF1 e o BCRF1, Pallesen et al., 1991, relataram que a LMP1 era capaz de induzir uma expressão aumentada de *bcl-2*, o que provocaria a transformação e imortalização de linfócitos. Trabalhos mais recentes, entretanto, não observaram, *in vivo*, tal associação e consideraram que a expressão aumentada de *bcl-2* observada na DH não se correlacionava com a presença de LMP1 (Armstrong et al., 1992; Khan et al., 1993; Tao et al., 1994).

A distribuição geográfica do EBV tem peculiaridades interessantes. No ocidente o tipo mais encontrado é o EBV- 1, enquanto na África observam-se ambas as espécies. 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 agressividade deste subtipo, refletindo-se em incapacidade para infectar os linfócitos sangüíneos (Khanna et al., 1995; Kieff, 1996).

A infecção pelo EBV inicia-se pelo epitélio da orofaringe, onde pode produzir faringite sintomática. Neste local, o vírus estabelece uma infecção persistente às custas de repetidos ciclos de replicação, morte celular, liberação do vírus e infecção de novas células. Em seguida, ocorre o comprometimento de linfócitos B que circulam próximo ao sítio primário. A infecção dos linfócitos B é provavelmente resultado da inibição que as proteínas codificadas pelo gene BCRF1, homólogo da IL- 10, realizam sobre as células “natural killer” (NK) e linfócitos T CD8 + do hospedeiro. O EBV, através de sua glicoproteína gp350, adere ao receptor específico C3d presente na membrana do linfócito B, penetrando em seguida no mesmo, induzindo a síntese de RNA e DNA, secreção de imunoglobulina (Ig), expressão de marcadores de ativação do linfócito B, conduzindo-o para imortalização, através de persistente proliferação, mediada por antígenos característicos do período de latência, como veremos adiante.

Em experimentos com linfoblastos observou-se que durante a infecção latente pelo menos 11 genes são expressos : EBER1 e EBER2, EBNA1 a EBNA6 (outra nomenclatura utilizada para os antígenos nucleares é EBNA1, EBNA2, EBNA3a, EBNA3b, EBNA3c) e LMP1, LMP2A e LMP2B. EBNA2 e EBNA5 são os primeiros antígenos nucleares expressos, sendo que o primeiro ativa alguns genes celulares como CD 23 e CD21 e também genes virais, inclusive LMP1 e LMP2. *In vitro*, são necessários aproximadamente 48 horas desde a infecção inicial do linfócito B para que as EBNAs alcancem níveis que persistirão durante toda o período latente. Ao contrário, os níveis de EBERs só serão significativos após 70 horas (Khanna et al.,1995).

Diferente da fase latente da infecção, quando apenas um número limitado de antígenos são produzidos, durante a infecção lítica observa-se mais de 80 RNAs virais específicos. Tomando por base o tempo de surgimento destes antígenos, convencionou-se classificá-los em precoces (EA- “early antigens”) e tardios. Os EA compõem-se de uma série de polipeptídeos, como BZLF1, ativador da transcrição; BALF5, DNA polimerase; BORF2 e BARF1, ribonucleotídeos redutases; BXLF1, uma timidina quinase; e BHRF1, um antígeno citoplasmático (Khanna et al.,1995).

1.2.1 Associação do EBV com diferentes patologias

1.2.1.1 Mononucleose infecciosa (MI)

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 a presença de anticorpos heterófilos no soro e linfocitose atípica, com leucometria variando de 12000 μ l a 18000 μ l, dos quais 60% são de linfócitos. As manifestações clínicas mais comuns compreendem febre, linfadenopatia generalizada, esplenomegalia e faringite. Nos países desenvolvidos, a MI é mais comum entre os 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 nas crianças, onde quase todas estão infectadas antes de concluir o primeiro ano de vida, e evolução clínica assintomática (Contran et al., 1994; Abreu, 1996). O sítio primário da replicação viral é o epitélio da orofaringe, com posterior comprometimento de linfócitos B circulantes e disseminação da infecção. Nos linfonodos comprometidos, podem-se encontrar células semelhantes às células RS, gerando, ocasionalmente, confusão com a DH.

1.2.1.2 Linfoma de Burkitt (LB)

É um linfoma folicular difuso de células B no centro dos folículos, observado de forma endêmica na África. A doença predomina no sexo masculino (relação homem/mulher na África 8:5; na América 2:1) e a idade média no início da doença nas crianças africanas é sete anos, enquanto que nas crianças americanas é 11 anos (DeVita & Ultmann, 1988). São reconhecidas três formas: endêmica, esporádica e associada com AIDS. A apresentação endêmica é responsável por aproximadamente metade de todos os linfomas que ocorrem na infância na África equatorial e Nova Guiné, com incidência de 8 a 10 casos por 100.000 pessoas/ano (Khanna et al., 1995).

A apresentação clássica do linfoma de Burkitt é de um tumor extralinfático que se origina na mandíbula. Mas, ele tem predileção também pelas vísceras abdominais, particularmente os ovários, bem como para as mamas e meninges.

Apesar da heterogeneidade clínica, encontra-se em todas as formas um das três tipos de translocações com o envolvimento do cromossoma 8q24, próximo ao *locus* do *c-myc*, e de um dos cromossomas (2, 14, 22) que contém um dos três genes codificadores da cadeia pesada das imunoglobulinas. A translocação mais comum é t(8;14) (Contran et al., 1994; Khanna et al., 1995).

A associação do LB com EBV é baseada na demonstração do genoma viral na maioria dos tumores das áreas endêmicas (95% dos casos) e no fato de que os pacientes com LB apresentam freqüentemente títulos elevados de anticorpos anti-EBV aproximadamente 5 anos antes do surgimento clínico da neoplasia.

Acredita-se que o processo infeccioso desenvolva-se em três estágios : no primeiro ocorre a infecção primária, com comprometimento de linfócitos B imaturos; no segundo estágio estão implicados 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 supressores da resposta celular T, e, finalmente, 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. Atualmente, existe evidência também de que o EBNA1, único antígeno do EBV expresso no LB, pode participar na desregulação do *c-myc*, contribuindo, assim, com a proliferação celular (Khanna et al., 1995).

1.2.1.3 Carcinoma nasofaríngeo (CNF)

É um tumor de origem epidermóide, 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, em algumas partes da África é o principal câncer na infância. Nos Estados Unidos, por outro lado é uma neoplasia extremamente rara tanto em crianças quanto em adultos.

O CNF pode assumir um dos três seguintes padrões : 1- carcinoma de células escamosas, queratinizante, 2- carcinoma de células escamosas, não queratinizante e 3- carcinoma indiferenciado, que possui abundância de um infiltrado linfocitário não neoplásico.

A associação entre o CNF e o EBV está fundamentada na observação de anticorpos IgA contra antígenos virais e pela presença de uma quantidade elevada de antígenos virais de cápsula em pacientes com CNF quando comparado com controle. Além do mais, o genoma viral tem sido detectado nas células epiteliais do tumor na maioria dos casos de CNF indiferenciado e carcinoma não queratinizado de células escamosas (EBNA1 em aproximadamente todos os casos, enquanto LMP1 e LMP2 em 75% dos casos de CNF positivos para EBV), porém não se tem registro de oncogenes associados ao vírus (Contran et al., 1994).

1. 3 Associação da DH com o EBV

MacMahon , 1966, foi o primeiro a descrever a bimodalidade na incidência da DH e propor que ela era uma patologia heterogênea, cujas características epidemiológicas, baseadas na idade, permitiam distinguir 3 subgrupos. O primeiro subgrupo compreendia a faixa etária de 0 a 14anos, sendo 85% dos casos do sexo masculino, com maior predominância nas zonas rurais. O segundo envolvia os casos entre 15 e 34 anos, com os indivíduos apresentando elevado padrão socio-econômico e maior prevalência no sexo masculino (54%). Finalmente, o terceiro subgrupo era formado por pessoas com mais de 50 anos e compreendia pacientes com elevado padrão socio-econômico. A prevalência do sexo masculino nesta faixa era de 63%.

Para tentar explicar a bimodalidade, MacMahon propôs que a DH resultaria de dois mecanismos distintos. A forma observada entre adultos jovens seria causada por um agente

biológico de baixa infectividade, e aquela encontrada entre idosos teria gênese semelhante aos outros linfomas, portanto, com características eminentemente neoplásicas.

Corroborando a hipótese de MacMahon da existência de um processo infeccioso na DH, Levine et al., 1971, detectaram títulos de anticorpos anti-EBV significativamente mais elevados nos pacientes com DH (1:367) do que naqueles com outros linfomas (1:132) e nos controles normais (1:90). A presença de títulos de anticorpos elevados em pacientes não tratados, segundo o pesquisador, estava associada a sintomatologia mais exuberante e pior evolução. Neste trabalho não foi encontrado título elevado de anticorpos para outros herpesvírus (*Herpes simplex* tipo I e tipo II, citomegalovírus e o vírus da varicela), sugerindo que a presença do EBV na DH talvez não se devesse a uma infecção oportunista.

Mueller et al., 1989, mostraram, também, que a presença de título elevado de anticorpos contra EBNA, partícula nuclear do EBV, constitui forte fator de risco para desenvolvimento da DH, sendo o Risco Relativo (RR) igual a 4,0. Eles relataram, ainda, que títulos elevados de IgG e IgA contra antígenos da cápsula viral equivalem a um Risco Relativo de 2,6 e 3,7, respectivamente.

A suspeita da existência de associação entre a mononucleose infecciosa e a DH reforça a hipótese de etiologia infecciosa para esta neoplasia. Muitos autores descreveram esta relação (Rosdahl et al., 1974; Connelly & Christine, 1974; Evans & Gutensohn, 1984). O primeiro ponto em comum refere-se às alterações morfológicas encontradas na MI que se assemelham em muitos casos àquelas presentes em processos linfoproliferativos, tendo a doença sido considerada antigamente como uma forma limitada e reversível de leucemia linfocítica (Henle *Apud* Levine et al., 1971). Outro dado importante sobre as características histológicas é a presença na MI de células morfológicamente semelhantes as células RS, mostrando que o EBV pode exercer de fato um papel transformador sobre os linfócitos e que em certos casos, provavelmente sob influência ambiental, indivíduos com história anterior de MI apresentam risco 2 a 3 vezes maior para desenvolver DH, quando comparado com o grupo sem história pregressa para esta infecção (Evans & Gutensohn, 1984).

Kaplan *Apud* Connelly & Christine, 1974 acompanhou 29 casos de DH que apresentavam história bem documentada de MI e pôde constatar que havia um intervalo de tempo médio de 4 anos entre o início da infecção e o surgimento da neoplasia. A idade média por ocasião do diagnóstico de MI foi 20 anos e 24 anos foi a média da idade dos que desenvolveram DH.

No trabalho ‘Hodgkin’s disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years’ experience, Rosdahl et al., 1974, mostraram que havia um risco maior de contrair DH nos indivíduos do sexo masculino com o teste de Paul-Bunnell positivo, de maneira que o número total de pacientes com DH neste grupo foi maior que o esperado ($p < 0,002$). 9 dos 12 com história de MI desenvolveram DH 2 ou 3 anos após o diagnóstico da infecção. Neste estudo, observou-se também que o risco para desenvolver DH é maior naqueles que contraíram MI tardiamente, com idade superior a 20 anos.

Connelly & Christine, 1974, estudaram 4.529 casos de MI e verificaram que o risco de desenvolver linfoma maligno, particularmente DH, neste grupo é superior ao esperado (Risco Relativo = 3,7). O intervalo entre a MI e o surgimento da DH variou entre 3 a 11 anos. Todos os casos tinham menos de 21 anos (a idade média foi 16 anos) quando apresentaram MI e menos de 30 anos quando desenvolveram DH (idade média = 24 anos). De acordo ainda com o trabalho, o risco de desenvolver outro tipo de câncer nos pacientes com MI foi apenas discretamente elevado (Risco Relativo = 1,4), podendo, inclusive, ter sido decorrente do acaso.

Com o desenvolvimento das técnicas de imunohistoquímica, que utiliza anticorpos monoclonais para o diagnóstico, e da biologia molecular, que permite identificar o DNA viral na célula neoplásica, temos experimentado uma revolução no entendimento das neoplasias linfóides, proporcionando a confirmação das suspeitas levantadas anteriormente pelos inquéritos epidemiológicos e pelas observações clínicas.

Coube a Poppema et al., 1985, a demonstraco pela primeira vez na literatura da presença de EBNA nas células RS, através da técnica da imunoperoxidase em um paciente de 69 anos, com DHCM.

A demonstraco da associao definitiva do EBV com a DH ocorreu, entretanto, com Weiss et al., 1987. Utilizando a técnica de Hibridizao por "Slot Blot" eles puderam detectar a presença do genoma viral em 19% dos casos estudados (4 dos 21). Os subtipos histológicos dos casos positivos estudados foram 2 de DHCM e 2 de DHEN. O achado foi considerado significativo, porque, com exceo das glândulas salivares, não se detecta o EBV em outros tecidos e além do mais, não se observou invasão por outros vírus, o que poderia caracterizar infeco oportunista.

A técnica de Hibridizao por "Slot Blot" utilizada no trabalho anterior não permitia determinar a origem celular do genoma viral. Assim, em 1989, Weiss et al. preconizaram o uso da técnica de Hibridizao *In Situ* (HIS) numa série de 16 pacientes e puderam comprovar a presença do DNA do EBV no núcleo da células RS em 19% dos casos analisados, todos com DHEN. O genoma do vírus foi encontrado num padrão monoclonal, refletindo provavelmente uma proliferao monoclonal dos linfoblastos devido a imunodeficiência ou a infeco pelo EBV. Os autores concluíram então que o EBV desempenhava um papel importante na patogênese da DH, em pelo menos parte dos casos, e que a positividade na minoria dos casos poderia ser decorrente da presença do genoma viral em propores não detectáveis pelas tnicas utilizadas.

Anagnostopoulos et al., 1989, confirmando os achados anteriores, detectaram proliferao monoclonal do EBV em 7 dos 42 casos estudados. Os dados foram compatíveis com proliferao celular posterior a infeco viral, reforçando a tese de que o EBV tem um papel direto na patogênese da doença, participando como agente precipitador da divisão celular.

Pallesen et al., 1991, demonstraram que um outro produto viral, a LMP,  expresso em quantidade significativa pelas células RS (48%) em proporo que varia de acordo com o subtipo histológico : DHPL 1/10 [10%]; DHEN 16/50 [32%]; DHCM 23/24 [96%]. Os autores

notaram ainda uma diferença na expressão dos genes latentes, de acordo com a patologia. Assim, enquanto a DH apresenta o seguinte fenótipo LMP+, EBNA 2 -; o LB tem LMP -, EBNA2 - e a MI LMP +, EBNA 2+. Como a LMP tem capacidade de induzir transformação e imortalização de linfócitos, provavelmente via expressão aumentada de *bcl-2*, os pesquisadores concluíram que a presença do EBV nos casos de DH não é algo sem importância, devendo o mesmo ter um papel direto na gênese da doença.

Simultaneamente, Herbst et al., 1991, utilizando também imunohistoquímica, detectaram a presença da LMP em 18 dos 47 casos estudados (38%), com padrão fenotípico semelhante. Surpreendentemente, entretanto, eles não encontraram em nenhum caso a glicoproteína viral gp350/250 que, como se sabe, é essencial para a aderência do vírus.

Por outro lado, Wright et al., 1991, examinando 65 linfonodos de pacientes com DH pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), encontraram o gene viral em 40% dos casos, sem diferença estatística significativa entre os subtipos (55% dos casos com DHPL, variante difuso; 25% dos casos com DHPL, variante nodular; 33% dos casos com DHEN; 40% dos casos com DHCM e 55% dos casos com DHDL). A positividade no grupo controle foi de 25%, com menor amplificação do DNA do EBV.

Os resultados obtidos pela PCR são semelhantes àqueles conseguidos pela HIS, com vantagem sobre esta última, pois permite a detecção da procedência do genoma viral, conforme foi mostrado pelo trabalho anterior e outros (Weiss et al., 1991).

A epidemiologia da DH tem comportamento peculiar, particularmente no caráter social, onde se percebem diferentes picos de incidência que dependem do maior ou menor desenvolvimento de uma região. Assim, nos países desenvolvidos o pico inicial ocorre nos adultos jovens, com predominância do subtipo DHEN, enquanto nos países em desenvolvimento, inclusive o Brasil, o primeiro pico acontece na infância e o segundo na velhice, sendo o subtipo DHCM o mais freqüente. Apresentamos a seguir uma série de trabalhos que demonstram estas características epidemiológicas da DH, o que acaba por reforçar a hipótese de que um agente

ambiental seja responsável, ou pelo menos contribua para o desenvolvimento deste linfoma. Adiante, no item que contém os resultados deste trabalho, faremos uma correlação entre desenvolvimento e positividade ao EBV.

Em um estudo de 55 casos de DH em crianças de diferentes países, Armstrong et al., 1993, encontraram o EBV em 38, sendo 13 dos 22 casos do Reino Unido, 18 dos 25 casos do Brasil (São Paulo) e 7 dos 8 casos da Arábia Saudita. Entre os subtipos histológicos, o DHCM foi o mais comum na Arábia Saudita e Brasil, apresentando também maior proporção de casos positivos para o EBV (7/7 Reino Unido; 10/12 Brasil e 5/5 Arábia Saudita). O subtipo DHEN foi mais freqüente no Reino Unido, sendo que dos 12 casos, 4 foram positivos para o EBV. Os autores identificaram ainda risco elevado no grupo de pacientes menores de 10 anos, de modo que entre os 27 casos pertencentes a este grupo, 24 relacionaram-se com o EBV, porém não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os países ou sexo.

Ambinder et al., 1993, realizaram um estudo comparativo da DH em crianças com menos de 15 anos de idade em Honduras e E.U.A. Os autores encontraram a presença do EBV em todos os casos de Honduras, tendo sido o subtipo DHCM o mais freqüente; já no outro grupo houve positividade em apenas 36% dos casos, com o subtipo DHEN constituindo o maior número de casos, apesar de 6 dos 7 casos de DHCM terem sido positivos para o EBV, demonstrando que este subtipo tem íntima associação com o vírus, mesmo nos países desenvolvidos. A distribuição dos casos de acordo com o sexo foi equilibrada em ambos os países, sem diferença significativa.

No Peru, Chang et al., 1993, utilizando a técnica de HIS detectaram o EBV nas células RS e variantes em virtualmente todos os casos pesquisados (94%). Vinte e cinco casos eram do sexo masculino e sete do sexo feminino. A idade dos pacientes variou entre 2 e 75 anos, com a idade média de 9 anos, sendo que $\frac{3}{4}$ dos doentes tinham menos de 40 anos. O subtipo histológico mais comum foi DHCM (63%), seguido por DHEN (22%). LMP-1 foi identificada em 83% dos casos EBER-1 positivos, fortalecendo o papel de destaque que o EBV deve ter na

etiopatogênese da DH, uma vez que este produto viral tem importante atividade oncogênica, conforme vimos anteriormente (Pallesen et al., 1991).

Gulley et al., 1994, observaram, por outro lado, que a idade e a localização geográfica são variáveis menos importantes na prevalência da DH do que a categoria raça. Eles analisaram 125 casos, sendo 79 dos E.U.A, 31 da cidade do México, 15 da Costa Rica e encontraram, utilizando a HIS, EBER 1 nas células RS em 48% dos casos, assim distribuídos: 27/74 dos casos dos E.U.A (36%); 24/31 casos do México (77%) e 5/14 casos da Costa Rica (36%). Quando analisaram os grupos étnicos envolvidos, observaram que a positividade foi consideravelmente maior entre os hispânicos (59%). Entre os não-hispânicos a positividade foi de apenas 23%. Finalmente, concluíram que o subtipo DHCM estava fortemente associado com o EBV (77% dos casos).

Na Argentina, Preciado et al., 1995, estudaram 41 casos de DH na infância e acharam positividade para o EBV em 54% dos pacientes. Foram pesquisados EBER e LMP por HIS e imunohistoquímica, encontrando-se 20 casos EBER+/LMP+ e 2 casos EBER+/LMP-. Os resultados apontaram o sexo masculino com maior número de casos, com um total de 32 pacientes. Enquanto que, com relação ao subtipo histológico, notou-se que o DHCM reunia o maior número de casos positivos (19/25 EBER+; 17/25 LMP+). No tocante à idade, os casos foram divididos em dois grupos: 2 a 6 anos e 7 a 15 anos, constatando-se que no grupo mais jovem houve forte associação com EBV, estatisticamente significativa ($p = 0,0004$).

Na Coreia, EBER foi detectado em 69% dos casos estudados pela HIS, com incidência elevada no subtipo DHCM (75%). Apesar de terem sido estudados 68 pacientes do sexo masculino e 19 do sexo feminino, não se observou diferença significativa com relação à presença do EBV nesta variável. No que se refere à idade, notou-se uma bimodalidade na ocorrência dos casos, sendo as duas faixas de pico < 15 anos e >50 anos (Huh et al., 1996).

Weinreb et al., 1996, examinaram material de 101 pacientes do Quênia, 53 com menos de 16 anos e 48 maiores de 16 anos, e encontraram no primeiro grupo positividade para o EBV

em 100% dos casos (25 DHEN, 16 DHCM, 5 DHDL, 2 DHPL), enquanto no grupo dos adultos detectaram em apenas 63% (26 dos 39 DHEN, 2 dos 2 DHCM, 2 dos 4 DHDL, 2 dos 3 DHPL).

Já Peh et al., 1997, demonstraram num estudo multi-étnico realizado na Malásia que a associação da DH e o EBV é mais consistente em pacientes menores de 15 anos. Eles encontraram uma prevalência do EBV em 93% neste grupo etário e apenas 52% naquele com mais de 15 anos. No primeiro grupo, o subtipo mais freqüente foi DHCM (47%) e no segundo foi DHEN (51%). Eles notaram que mesmo nos casos com mais de 15 anos, quando o diagnóstico era DHCM, a presença do EBV podia ser comprovada em 86% dos casos, reforçando a tese de que o EBV está relacionado na patogênese de pelos menos este subtipo.

Também Razzouk et al., 1997, encontraram uma forte associação do EBV com a DH em crianças menores de 10 anos. Os autores realizaram um estudo comparativo entre casos de DH no Brasil (Curitiba) e E.U.A, com distribuição semelhante entre os subtipos histológicos e não detectaram diferenças significativas em relação à localização geográfica (58% de casos positivos em ambos), mas observaram que a presença do EBV era marcante nos pacientes menores de 10 anos, sendo que entre os brasileiros nesta faixa etária, 74% estavam associados com o EBV, enquanto apenas 15% no grupo mais velho foi positivo para EBER1. De modo semelhante, 76% dos casos americanos positivos tinham idade inferior a 10 anos, enquanto apenas 22% foram positivos no grupo mais velho.

Abreu, 1996, pesquisando sobre a DH infanto-juvenil (<18anos) no Ceará identificou positividade geral de 85,29%, com maior freqüência para o subtipo DHCM, onde todos os casos foram positivos para o EBV. O subtipo DHEN foi o segundo mais comum, com uma positividade de 50%. A distribuição dos casos, através do sexo foi equilibrada, sendo 18 do sexo masculino e 16 do sexo feminino.

As informações sobre a associação da DH e o EBV em nosso meio são escassas e os trabalhos que correlacionam sistematicamente os aspectos epidemiológicos desta relação em diferentes países são bem reduzidos, dificultando uma melhor compreensão das informações até

agora disponíveis. Assim, pretende-se com este trabalho reunir os dados de diferentes pesquisadores, assinalar os pontos convergentes, de maneira que seja possível nortear futuras pesquisas nesta área.

2. OBJETIVOS

1. Geral

Investigar analiticamente a associação da DH com o EBV numa amostra de 50 casos da DH, reunidos no estado do Ceará, Brasil, entre 1985 a 1996.

2. Específicos

2.1. Descrever, na amostra considerada, a distribuição da doença de Hodgkin de acordo com as variáveis sexo, subtipos histológicos, idade e localização anatômica das biópsias;

2.2. Correlacionar a presença do EBV com os subtipos histológicos da doença de Hodgkin;

2.3. Analisar comparativamente a associação da DH e o EBV nos pacientes infanto-juvenis (menores de 18 anos) e adultos (maiores de 18 anos) no Ceará, a partir da amostra em estudo;

2.4. Observar a possível existência de correlação entre situação econômica das regiões envolvidas no estudo e a presença de EBV na DH;

2.5. Verificar a presença do EBV em outras biópsias linfonodais, de natureza neoplásica ou não.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho consiste numa análise descritiva de uma amostra de casos de DH no Ceará e suas possíveis relações com o EBV.

1- Pacientes:

Foram selecionados 50 doentes com diagnóstico histopatológico de DH, os quais foram divididos em dois grupos: A) < de 18 anos ou infanto-juvenil e B) > de 18 anos ou adulto. O grupo infanto-juvenil é constituído de 34 casos reunidos pela Dra. Eliane Souto de Abreu, quando da elaboração de sua tese de mestrado no Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), em 1996. Nele foram incluídos biópsias ganglionares provenientes do Hospital Universitário Walter Cantídio e do Hospital Infantil Albert Sabin, entre 1985 e 1995. O grupo adulto possui 16 casos da DH. Treze destes procederam do DPML da Faculdade de Medicina da UFC e três casos foram oriundos do Laboratório Carlos Chagas, instituição privada, sediada em Fortaleza-Ce. O levantamento dos casos adultos foi realizado a partir do ano de 1987 e prosseguiu até 1996, totalizando 147, mas apenas os que foram utilizados na pesquisa estavam disponíveis.

2- Grupo de referência:

A fim de observar o comportamento do EBV num grupo não doente e num outro grupo com doença correlata à DH e estabelecer um estudo comparativo com o grupo formado pela DH, foram instituídos 2 sub-grupos: 1º) linfadenite inespecífica, formado por 21 biópsias ganglionares, com este diagnóstico histopatológico, reunidos no DPML da UFC, entre os anos de 1992 e 1996, todas maiores de 18 anos; e 2º) linfomas não-Hodgkin, composto por 19 casos, da

mesma procedência do sub-grupo anterior, com idade maior que 18 anos (exceto 1 caso que tinha 15 anos), no período de 1992 a 1996. O objetivo, neste caso, é verificar o grau de associação do EBV em outras condições, que não a DH, tentando negar a hipótese de associação etio-patogênica entre o EBV e a DH.

3- Diagnóstico histopatológico:

O exame histopatológico de todas as biópsias foi realizado no DPML, da UFC e revisados no Departamento de Patologia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu- SP.

4- Detecção do EBV:

A verificação da presença do EBV no material em estudo, tanto do grupo da DH quanto no grupo de referência, foi realizada pelo Departamento de Patologia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, através da técnica de Hibridização *In Situ*. Sumariamente, este método consiste na detecção do genoma viral nas células RS, a partir de uma sonda pré-fabricada formada por sequências oligonucleotídicas de DNA que se ligam a seus correspondentes no mRNA viral. A visualização da hibridização foi feita através do método ABC e na revelação utilizou-se a solução diaminobenzidina (DAB) (vide detalhamento da técnica no anexo).

5- Análise estatística:

Aplicou-se o teste do Qui- quadrado (X^2) clássico para avaliar a significância da associação entre positividade para o EBV e os subtipos da DH, bem como para analisar a relação entre casos positivos para o EBV e grupos etários infanto-juvenil e adulto, tentando, assim, identificar uma possível associação significativa.

A comparação com dados oriundos de 15 regiões economicamente distintas foi feita correlacionando-se os seus índices de positividade para o EBV com um indicador sócio-

econômico, denominado Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), através do Coeficiente de Spearman.

O IDH é um índice que avalia o desenvolvimento da população de um país ou região, considerando a qualidade de vida, o conhecimento e vida longa e saudável. Para tanto, este índice reúne três outros: expectativa de vida, grau de escolaridade e renda *per capita* da população. O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) consiste numa média simples desses três indicadores, variando em uma escala de 0 a 1 (Almanaque Abril, 1998).

A escassez de observações nos subtipos DHPL e DHDL levou-nos a considerar na análise estatística apenas os dados referentes aos subtipos DHCM e DHEN.

4. RESULTADOS

4.1. Grupo da doença de Hodgkin

4.1.1 Sexo e idade

A amostra em estudo foi composta por 50 casos de DH. 26 pacientes eram do sexo masculino, com idades variando entre 5 e 57 anos, sendo a idade média 19,4 anos e idade mediana 18,5 anos. 24 pacientes eram do sexo feminino, com idades entre 2 e 50 anos. A idade média neste gênero foi 18,8 anos e a idade mediana 13 anos. A idade média geral da amostra foi 19,1 anos, com idade mediana geral de 13 anos. A faixa etária onde se concentrou maior número de casos foi dos 2 aos 13 anos (25 casos).

Entre os pacientes menores de 18 anos, 17 eram do sexo masculino, com idade variando de 5 a 16 anos, idade média de 9,4 anos e idade mediana de 8 anos. Os outros 17 pacientes eram do sexo feminino, com idade variando entre 2 e 17 anos; idade média de 10,4 anos e idade mediana igual a 10 anos. A idade média do grupo menor de 18 anos foi 9,9 anos e a mediana 9,5 anos.

O grupo maior de 18 anos foi formado por pacientes cujas idades variaram de 21 a 57 anos, sendo a idade média de 38,7 anos e mediana 38, 5 anos. Havia 09 pacientes do sexo masculino, com idade variando entre 25 e 57 anos, sendo a idade média de 38 anos e a mediana de 36 anos. O sexo feminino apresentou 07 casos, com idade variando entre 21 e 50 anos, idade média 39,5 anos e mediana 42 anos.

4.1.2 Análise histológica da amostra e localização anatômica dos linfonodos

O diagnóstico de DHCM foi dado em 28 pacientes (56%), sendo 16 do sexo masculino e 12 do sexo feminino. 18 (36%) pacientes receberam o diagnóstico de DHEN, 7 pertencentes ao sexo masculino e 11 ao feminino. Apenas 3 (6%) pacientes tiveram o diagnóstico DHDL e 01(2%) não pôde ser classificado.

No grupo infanto-juvenil, 22 pacientes pertenciam ao subtipo DHCM, sendo 10 do sexo feminino e 12 do sexo masculino. 10 casos eram do subtipo DHEN, com 6 pacientes do sexo feminino e 4 do sexo masculino; 1 caso era do subtipo DHDL e 1 não foi classificado.

No grupo adulto, o subtipo histológico mais freqüente foi DHEN, com 08 pacientes, seguido de DHCM, com 06 pacientes e DHDL, com 02 pacientes.

Com relação à localização anatômica de origem dos gânglios linfáticos, observou-se que a região cervical reuniu o maior número de casos (34). A distribuição dos demais foi : região axilar – 09; região inguinal – 03; região abdominal – 01; mediastino – 01; região epitrocLEAR – 01; região supra-clavicular - 01 e região retroperitoneal-01 (Vide quadro 01 – anexo).

4. 2 Grupo de Referência

4.2.1 Linfadenite inespecífica

Este grupo foi formado por 21 casos de linfadenopatia reacional. A idade variou de 19 a 78 anos, com a média igual 39,7 anos. Nove casos (42,85%) eram do sexo masculino e 12 (57,15%) do sexo feminino.

A distribuição por região anatômica foi a seguinte: região cervical – 09; região axilar – 03; região inguinal – 02; mediastino – 01; região abdominal – 01; região retroperitoneal – 01. Em 04 casos não foi possível identificar a região anatômica (Vide quadro 2 – anexo).

4.2.2 Linfomas não-Hodgkin

Foram selecionados 19 casos com diagnóstico histopatológico de Linfoma não-Hodgkin, assim distribuídos, de acordo com a classificação “Working formulation” : LNH centrocítico – 04; LNH CBCC – 03; LNH linfocítico – 01; LNH anaplásico – 01; micose fungóide – 01; não classificado – 09. Em 06 casos o diagnóstico foi presumível.

A idade variou de 15 a 73 anos, sendo a idade média igual a 49,7 anos (em um caso a idade não foi disponível). Já com relação ao sexo, a amostra tinha 13(68,42%) casos masculinos e 06(31,58%) femininos (Vide quadro 03 – anexo).

4.3 Detecção do EBV em todas as amostras estudadas

A pesquisa do EBV nas amostras foi realizada pela técnica de HIS. No grupo infanto-juvenil foi realizado também a técnica da imunohistoquímica . A positividade para o EBV foi encontrada em 35 casos (70%). Dos 26 pacientes do sexo masculino, 19 (73,08%) foram positivos para o EBV, enquanto no sexo feminino, dos 24 casos, em 16 (66,7%) foram detectados o EBV.

A idade entre os casos positivos variou de 2 a 57 anos, sendo a idade média deste grupo de 14,37 anos e a idade mediana igual a 10 anos. A faixa etária com maior número de casos positivos para o EBV foi a mesma que concentrou o maior número de pacientes da amostra geral, ou seja, de 2 a 13 anos (25 casos). Todos os casos, portanto, menores de 13 anos foram

positivos para o EBV.

O subtipo histológico DHCM apresentou elevada positividade para o EBV. Dos 28 casos, 25 (89,28%) foram EBV (+), o que correspondeu a 71,42% de todos os casos positivos. O subtipo DHEN apresentou 8 (44,44%) casos positivos entre os seus 18 casos totais, equivalendo a 22,85% dos casos positivos. 1 caso dos 3 do subtipo DHDL e o único caso não classificado foram EBV (+), cada um representando 2,85% dos casos positivos .

Todos os casos do grupo de referência foram negativos para o EBV (Vide quadro 05 e 6- anexo).

4.4. Comparação entre a associação da DH e EBV nos grupos infanto-juvenil e adulto no Ceará

No trabalho realizado por Abreu, em 1996, que avaliou a presença do EBV numa amostra de 34 casos de DH infanto-juvenil (menores de 18 anos), a positividade geral foi 85,29%. O subtipo DHCM foi o mais freqüente, com 22 casos, onde todos foram positivos para o EBV. O subtipo DHEN veio em seguida com 10 casos, sendo a metade positiva.

No grupo adulto, objeto principal desta investigação, obteve-se uma positividade geral para o EBV de 37,50%. Dos 06 casos do subtipo DHCM, a metade foi positiva para o EBV e dos 08 do subtipo DHEN, 03 foram positivos para o EBV.

Tabela 4. Positividade para o EBV numa amostra de casos de DH, no Ceará entre 1985 e 1996, de acordo com subtipos histológicos e grupos etários.

+ EBV	Infanto-juvenil	Adulto
DHCM	22 (100%)	03 (50%)
DHEN	10 (50%)	03 (37,50%)
DHDL	01 (100%)	---
DHPL	---	---
Não Classificado	01 (100%)	---
Geral	29 (85,29%)	06 (37,50%)

Através do teste do Qui-quadrado observou-se a existência de relação altamente significativa entre o grupo infanto-juvenil e positividade para EBV.

Tabela 5. Positividade para o EBV nos grupos etários infanto-juvenil e adulto, em uma amostra de casos de DH, no Ceará entre 1985 e 1996.

	EBV (+)	EBV (-)	Total
Grupo infanto-juvenil	29	5	34
Grupo adulto	6	10	16
Total	35	15	50

$$X^2 = 11,83 \quad p < 0,01$$

4.5 Associação do EBV com os subtipos da DH nos grupos infanto-juvenil e adulto

Em virtude do pouco número de casos dos subtipos DHPL e DHDL, analisou-se a relação do EBV apenas nas formas DHCM e DHEN. Para tanto, utilizou-se também o teste do Qui-quadrado, que se mostrou bastante significativo.

Tabela 6. Positividade para o EBV nos subtipos DHCM e DHEN, de uma amostra de casos de DH, no Ceará entre 1985 e 1996.

	EBV (+)	EBV (-)	Total
DHCM	25	3	28
DHEN	8	10	18
Total	33	13	46

$X^2 = 10,86$ $p < 0,01$

4.6 Associação entre EBV e desenvolvimento sócio-econômico

A relação entre desenvolvimento e positividade para o EBV tem sido sugerida por diversos trabalhos (Ambinder et al., 1993; Abreu, 1996), porém, sem que a análise por um modelo estatístico mais rigoroso valide esta tese. Com a finalidade de tentar preencher esta lacuna, compilou-se informações sobre a associação da DH com o EBV em regiões com diferentes padrões de desenvolvimento econômico que foram submetidos a uma análise de correlação, através do Coeficiente de Spearman. Para aquilatar o desenvolvimento econômico das regiões envolvidas no estudo, utilizou-se o Indicador de Desenvolvimento Humano (IDH). Foram avaliados apenas os subtipos DHCM e DHEN porque o número de casos das outras formas histológicas eram insuficientes para garantir uma análise consistente (Vide quadro 07 – anexo e Gráfico abaixo).

5. DISCUSSÃO

Na análise da associação do EBV com a DH no Ceará, faremos alguns comentários prévios sobre os aspectos epidemiológicos da nossa amostra, considerando a frequência encontrada para as variáveis sexo, idade e subtipo histológico. Destacamos, inicialmente, que para se chegar à conclusões com maior validade geral, torna-se necessário um estudo mais específico, que envolva uma amostra mais ampla e significativa de casos.

No que diz respeito à variável sexo, não observamos diferença estatisticamente significativa. Ferreira et al., 1977, pesquisando em uma amostra maior (n = 120) de casos do Ceará, encontraram predomínio do sexo masculino. Os autores destacaram, contudo, que a diferença tornava-se menor à medida que a idade aumentava, fato concordante com os achados de Correa & O'Conor, 1971, na Colômbia. Pitombeira et al., 1987, identificaram também preferência pelo sexo masculino (3,0:1) no grupo de 105 pacientes infanto-juvenis que avaliou, a maioria proveniente do Ceará.

Com relação à distribuição da DH por idade no estado do Ceará, destacamos novamente o trabalho de Ferreira et al., 1977, que encontraram no Ceará um agrupamento de casos da DH nas faixas etárias de 20 a 49 anos e após os 60 anos. Já Pitombeira et al., 1987, estudando casos com menos de 18 anos, a maioria do Ceará, notaram um pico entre 6 e 7 anos e outro aos 15 e 16 anos. Estas informações estão de acordo com McMahon, 1966, que descreveu uma curva bimodal para a idade nesta patologia. Na amostra referida, o 1º pico acontecia entre 15 e 34 anos e o 2º com 50 ou mais anos de idade.

Os dois grupos selecionados neste trabalho foram reunidos em momentos e locais distintos, de modo que não é possível avaliá-los homogeneamente no que se refere à idade. Observou-se, entretanto, que o grupo menor de 18 anos, reunido por Abreu, 1996, apresentou predominância de pacientes na faixa etária de 2 a 10 anos, achado consonante com o de outras regiões em desenvolvimento, onde a doença é mais freqüente em crianças, particularmente menores de 10 anos. (Gutensohn & Cole, 1977; Weinreb et al., 1996).

A Análise genérica da amostra revela que existe predominância do subtipo DHCM, responsável por 28 (56%) dos 50 casos. Os trabalhos de Ferreira et al., 1977, e Pitombeira et al., 1987, também destacaram este subtipo como o mais freqüente no Ceará.

Este fato está em acordo com os estudos de pesquisadores de outras regiões que também apresentaram um maior registro de casos desta forma da DH em locais que se encontram em desenvolvimento. (Chang et al., 1993; Preciado et al., 1995; Glaser et al., 1996; Razzouk et al., 1996). É interessante notar que no grupo de adultos o subtipo DHEN foi o mais freqüente, com 8 casos. Este achado é semelhante ao encontrado por Ferreira et al., 1977, que notaram uma forte associação deste subtipo com grupos etários adultos. Deve-se notar, entretanto, que o grupo infanto-juvenil apresentou 10 casos do subtipo DHEN.

A maioria dos linfonodos da amostra (34) pertenciam à região cervical, confirmando as informações de outros autores que apontam este sítio como sede mais comum das manifestações primárias da DH (Lee et al., 1993). Em seguida, veio a região axilar com 9 linfonodos. 23 (67,64%) linfonodos da região cervical foram EBV (+), enquanto apenas 4 (44,44%) da região axilar mostraram-se positivos.

A presença do EBV nas amostras avaliadas foi elevada (70%), sendo compatível com trabalhos de outros pesquisadores (Chang et al., 1993; Armstrong et al., 1993; Ambinder et al., 1993; Weinreb et al., 1996; Peh et al., 1996) que relataram alta positividade para EBV em amostra provenientes de regiões em desenvolvimento.

A distribuição dos casos EBV (+) por sexo foi equilibrada, não tendo sido observado qualquer preferência pelo gênero em ambos os grupos. Isto está de acordo com dados da literatura (Ambinder et al., 1993; Armstrong et al., 1993; Preciado et al., 1995; Benharroch et al., 1996; Huh et al., 1996), apesar de Chang et al., 1993 e Gulley et al., 1994 terem encontrado uma maior positividade para o EBV no sexo masculino, sem todavia destacar o motivo aparente de tal discrepância.

Com relação à positividade do EBV nos grupos infanto-juvenil e adulto, é digno de nota a forte relação encontrada por Abreu, em 1996, no grupo infanto-juvenil. Além da alta positividade geral deste grupo (85,29%), todos os casos do subtipo DHCM foram EBV (+). Este resultado é equivalente àquele encontrado em regiões de economia semelhante à nossa, como Quênia e Honduras (Weinreb et al., 1996 e Ambinder et al., 1993, respectivamente). Há que se destacar ainda a predominância de casos positivos no grupo menor de 13 anos, onde todos foram EBV (+). Todos os casos negativos no grupo infanto-juvenil apresentavam mais de 13 anos.

Por outro lado, o grupo adulto revelou uma baixa positividade para o EBV (37,5%), fato intrigante já que ambos os grupos são oriundos da mesma região e, portanto, estão expostos, ao menos teoricamente, aos mesmos fatores ambientais. Isto nos faz crer que a idade em que se entra em contato com o vírus é fator determinante em relação à etiopatogênese da DH. Deste modo, pode-se supor que quanto mais precoce for o contato com o EBV maior será o risco relativo para o desenvolvimento futuro da DH. A baixa prevalência encontrada no grupo adulto do Ceará é semelhante aos resultados obtidos por pesquisadores em regiões desenvolvidas, o que reforça a hipótese acima, uma vez que nestas regiões a exposição ao EBV acontece mais tardiamente (Preciado et al., 1995). Parece, portanto, razoável supor que os pacientes adultos com DH compõem um subgrupo de pacientes que tiveram exposição tardia ao EBV, e que, à semelhança do que ocorre nos países em desenvolvimento, apresentaram melhor resistência à infecção viral, inibindo mais favoravelmente a possível ação oncogênica do EBV sobre os linfócitos, justificando, assim a menor associação do EBV com a DH nesta faixa etária.

No que se refere às diferenças observadas nos dois grupos etários, tem-se sugerido que a DH em crianças e adultos jovens apresenta diferentes sequências etiopatogênicas. O EBV estaria relacionado com a patogênese da doença em crianças, justificando assim a sua grande associação nesta faixa etária, particularmente nos países em desenvolvimento (Armstrong et al., 1993). Nestes países, além do fato de se adquirir o vírus em idade precoce (altos títulos de anticorpos anti-EBV e história anterior de MI, podem aumentar o risco para desenvolver DH em até 3 vezes[Rosdahl et al., 1974; Mueller et al., 1989]), tem sido observado em muitos pacientes a presença dos dois tipos de EBV. O EBV tipo 2, incomum nos países desenvolvidos, pode ser encontrado em até 40% das crianças com DH no Quênia, bem como em alguns casos de linfoma de Burkitt na África, refletindo um estado de imunodepressão secundária às baixas condições socio-econômicas e à agravos endêmicos, como a malária (Weinreb et al., 1996). Não se deve, entretanto, supor que a presença do EBV tipo 2 nestes casos seja fator decisivo e exclusivo, pois, como se sabe, o poder de transformar células deste tipo é inferior ao do tipo 1 (Dolcetti et al., 1997). Seria oportuno, entretanto, determinar futuramente a prevalência do EBV- 2 em nossos pacientes com DH, o que, se fosse comprovado, valorizaria os fatores de base sócio-econômicos na gênese da DH.

Weinreb et al., 1996, igualmente, observaram que a DH é um problema primariamente pediátrico. 49% dos pacientes estudados por eles tinham menos de 20 anos e 20% tinham menos de 10 anos. O EBV foi positivo em 100% das crianças com DH que estudaram, enquanto nos adultos apenas 63% foram LMPI-positivos. Ademais, nos pacientes menores de 10 anos foi detectada associação com EBV em 88,8%, enquanto que no grupo adulto jovem (15 a 34 anos) apenas 25,4% foram positivos para o vírus.

Chang et al., 1993, encontraram 91% de positividade para o EBV na amostra de casos peruanos que analisaram; atribuíram esta alta positividade à existência na amostra de pacientes com baixa idade. Deste modo, vê-se que os autores consideraram a pouca idade fator chave na associação da DH com o EBV.

Finalmente, ressaltamos que o estudo de correlação através do teste do Qui-quadrado, feito para verificar a relação entre faixa etária infanto-juvenil e positividade para o EBV nas amostras em estudo, mostrou-se fortemente significativo ($p < 0,01$), destacando forte relação entre positividade para o EBV e grupo etário infanto-juvenil, reforçando, portanto, a hipótese acima de que o vírus desempenha papel importante na patogênese da DH, mormente nos casos pediátricos.

No que se refere à associação do EBV com os subtipos histológicos, encontramos, em ambos os grupos, associação com a forma DHCM, correlação esta confirmado pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,01$). No grupo infanto-juvenil a relação foi mais gritante, pois todos os casos do subtipo DHCM eram EBV (+), enquanto apenas a metade do subtipo DHEN apresentou positividade ao EBV. Assim como a idade, este subtipo histológico está fortemente associado com o EBV. Até mesmo em países desenvolvidos, onde geralmente a positividade para o EBV é baixa, quando se considera isoladamente o subtipo DHCM e o EBV, encontra-se uma associação significativa (Ambinder et al., 1993; Peh et al., 1997). Razzouk et al., 1996, em estudo realizado nos Estados Unidos da América, particularmente entre menores de 10 anos, observaram forte associação do EBV com a forma DHCM.

Corroborando este postulado, Huh et al., 1996, referiram que muitos autores relataram uma maior taxa de detecção do EBV no subtipo DHCM. De acordo com os mesmos, a associação é mais alta em crianças menores de 15 anos e adultos com mais de 50 anos.

Que fatores podem justificar a forte associação do EBV com o subtipo DHCM?

As características histopatológicas (perda relativa de linfócitos, infiltrado celular heterogêneo e presença de numerosas células RS) do subtipo DHCM refletem uma deficiência relativa da resposta imunológica do hospedeiro ao agente viral, decorrente, provavelmente, de uma maior falência da imunidade T citotóxica. Tal fato ensejaria o crescimento de células RS LMP1 positivas, justificando, desde modo, o tropismo do EBV por este subtipo. (Pallensen et al., 1991; Peh et al., 1997). Isto pode responder à pergunta acima, ao menos parcialmente, se

considerarmos apenas as regiões subdesenvolvidas, onde baixas condições sócio-econômicas e ambientais contribuem para o estabelecimento de um estado sanitário precário e, conseqüentemente, afetam o sistema imunológico destas populações, predispondo-os à infecções precoces pelo EBV. Como explicar, todavia, a associação também observada em países desenvolvidos? Parece-nos que o comportamento do EBV neste subtipo é *sui generis*, lembrando uma entidade distinta, com potencial infeccioso predominante, conforme foi postulado por McMahon, em 1966. É razoável, portanto, afirmar, a partir das informações analisadas, que de fato o vírus, com todo seu potencial oncogênico, tal qual foi confirmado experimentalmente, contribui efetivamente na patogênese da DH neste subtipo particular. A baixa positividade encontrada por alguns autores, talvez se deva à utilização de métodos pouco sensíveis na detecção do vírus.

O estudo multigeográfico da correlação entre desenvolvimento econômico, aferido pelo IDH, e positividade para o EBV nos subtipos DHCM e DHEN, através do coeficiente de correlação de Spearman, revelou que quanto menor é o desenvolvimento de uma região, maior é a associação com o EBV, em ambas as formas. Dito de outra maneira, à medida que cresce o desenvolvimento decresce o número de casos EBV (+). É interessante notar então que mesmo no subtipo DHEN a associação com o EBV está atrelada às condições econômicas, tornando-se maior quando estas condições pioram. Desta forma, a baixa positividade para o EBV detectada por alguns autores em países desenvolvidos, talvez se deva a maior frequência de casos deste subtipo naqueles países. Ratificando esta proposição, podemos observar, pela análise da curva de correlação de DHEN, que este subtipo é um pouco mais “sensível” do que DHCM ao aumento do IDH, pois quando este coeficiente aumentou, a queda na positividade para o vírus foi mais intensa e evidente nesta forma. O subtipo DHCM apresenta positividade significativa para o EBV mesmo em regiões desenvolvidas, embora a força desta associação seja maior em regiões em desenvolvimento, conforme vimos anteriormente.

Entre as condições inerentes ao subdesenvolvimento que poderiam justificar maior suscetibilidade a DH, destaca-se a má nutrição crônica. Não há dúvida de que a carência

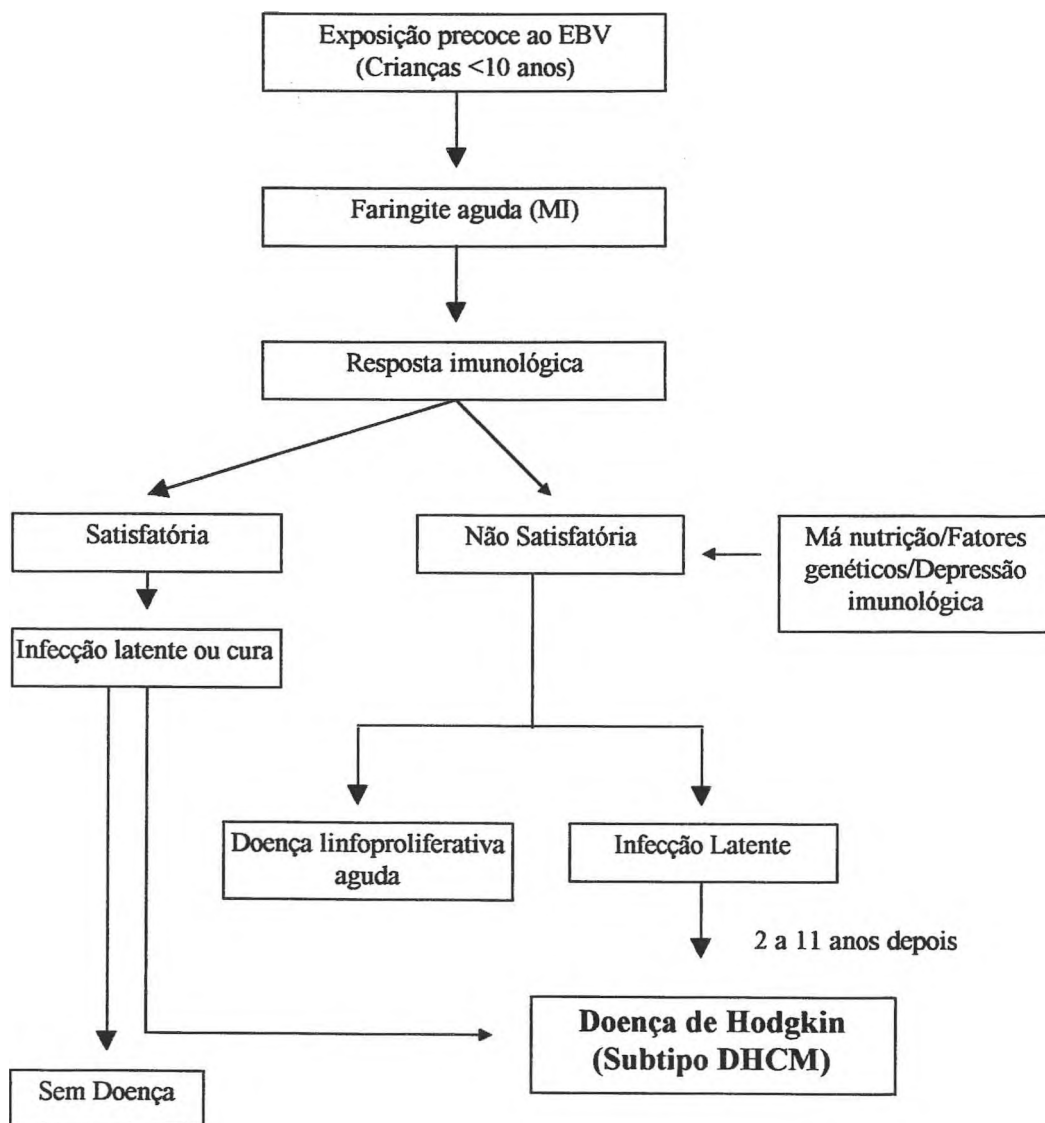
nutricional exerce impacto negativo sobre o sistema imunológico, contribuindo, destarte, para o surgimento de infecções oportunistas e neoplasias (Chandra et al., 1994).

Muitas enzimas essenciais ao equilíbrio imunológico necessitam da presença de diferentes micronutrientes para atuarem perfeitamente. A timidina quinase, por exemplo, necessita de zinco e ribonucleotídeo transferase precisa de ferro.

Segundo Chandra et al., 1994, as pessoas com déficit nutricional crônico apresentam alterações importantes no tecido linfóide. Histologicamente, no timo, existe perda da diferenciação corticomedular, redução do número de linfócitos e aumento, com degeneração dos corpúsculos de Hassal. No baço, ocorre perda de linfócitos nas adjacências dos pequenos vasos; nos linfonodos, há depleção linfocitária nas áreas timo-dependentes.

No que diz respeito à imunidade celular, particularmente afetada na DH, os autores afirmam haver redução do número de linfócitos T maduros, bem como decréscimo da população de células T auxiliares, às vezes de até 40%. As células T supressoras, entretanto, são menos afetadas. A razão célula Tauxiliar/célula Tsupressor está, portanto, reduzida nestas pessoas, o que configuraria, do ponto de vista morfo-funcional, um quadro de imunodeficiência adquirida relacionada à imunidade celular.

Diagrama 1. Modelo hipotético do desenvolvimento da DH no Ceará



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Apesar das amostras serem pequenas, estimamos que as relações encontradas são expressivas, pois, como se sabe, em tecidos normais, com exceção das glândulas salivares, não se tem demonstrado a presença do EBV, de modo que estes resultados se revestem de valor etiopatogênico.

O fato de todo o grupo de referência que utilizamos neste trabalho ter sido invariavelmente negativo para o vírus nos impede de negar a hipótese da associação etiopatogênica do EBV com a DH e demonstra a existência de uma especificidade do EBV por este linfoma, conforme descrito inicialmente por Weiss et al., 1987. A grande maioria dos linfomas não-Hodgkin (80 a 85%) (Contran et al., 1994) origina-se de linfócitos B, o que é semelhante ao que ocorre com a DH. Por que o comportamento histológico destas neoplasias é tão distinto ao ponto de permitir agrupá-las separadamente não tem explicação plausível até a presente data? A resposta talvez seja que na DH, ao menos no subtipo DHCM, existiria participação do EBV, que com seu potencial oncogênico, contribuiriam no processo de transformação maligna dos linfócitos B. Enquanto nos linfomas não-Hodgkin existe predominância de células neoplásicas nos linfonodos comprometidos, na DH encontra-se um infiltrado inflamatório não neoplásico, em

muitos casos mais abundante do que as células RS, lembrando uma resposta imunopatológica contra agente infeccioso.

O argumento de que a presença do EBV nos pacientes com DH seja decorrente de depressão imunológica é questionável, pois além de não se detectar o genoma de outros vírus oportunistas nestes pacientes, o genoma do EBV só é encontrado nos tecidos comprometidos, o que invalida esta hipótese (Weiss et al., 1987).

Além do mais, a curva bimodal da DH para a idade, o achado de padrão monoclonal do vírus achado nas células neoplásicas, a relação entre baixa condição sócio-econômica e presença do EBV e a comprovação experimental do poder transformador e de imortalização de linfócitos demonstram que a presença do EBV na DH não é um achado fortuito, mas sim que o vírus desempenha papel relevante na patogênese deste linfoma.

Não obstante as considerações acima, devemos ressaltar que existem indícios de predisposição genética para a DH, conforme descrito por Diehl & Tesch *Apud* Jandl, 1996. Estes cientistas pesquisaram a prevalência da DH em gêmeos dizigóticos e monozigóticos. Nenhum dos 187 gêmeos dizigóticos desenvolveram a DH, enquanto 10 dos 179 gêmeos monozigóticos acompanhados prospectivamente apresentaram a doença.

Seguindo esta linha de raciocínio, Gulley et al., 1994, relataram 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 pode ser relevante na etiopatogênese da DH.

Enumeramos a seguir as conclusões a que chegamos, tendo em vista os objetivos que foram propostos:

- 1- Existe predominância no Ceará do subtipo DHCM, sobretudo em indivíduos menores de 10 anos, pois foi nesta faixa etária onde se concentrou o maior número de casos. A

preferência pelo sexo masculino encontrada por Ferreira et al., 1977 e por Pitombeira et al., 1987, não pôde ser reproduzida na amostra, pois a mesma apresentou distribuição equivalente em relação a esta.

2- A prevalência do EBV na amostra foi alta (70%), com forte associação no subtipo DHCM, que apresentou 89,28% dos casos positivos.

3- A relação do EBV com a DH no Ceará foi muito mais evidente no grupo infanto-juvenil (85,29% contra 37,5% do grupo adulto), onde o teste de X^2 revelou-se altamente significativo ($p < 0,01$).

4- Verificou-se a existência de relação inversamente proporcional entre condições sócio-econômicas e positividade para o EBV nos subtipos DHCM e DHEN, fato este demonstrado através do coeficiente de correlação de Spearman. A forma DHEN mostrou-se mais sensível à variação crescente do IDH.

5- Estes resultados apoiam a tese de associação etiopatogênica do EBV com a DH, uma vez que, além de ter havido forte associação entre o vírus e doença, nenhum caso do grupo de referência apresentou positividade para o EBV.

Concluindo, gostaríamos de ressaltar que apesar dos fortes indícios que apontam uma relação da DH com o EBV, conforme analisamos ao longo desta dissertação, a etiopatogenia da DH continua sendo um enigma e um vasto campo para investigação científica, que certamente não decepcionará aqueles que se sentem estimulados por grandes desafios.

7. ANEXOS

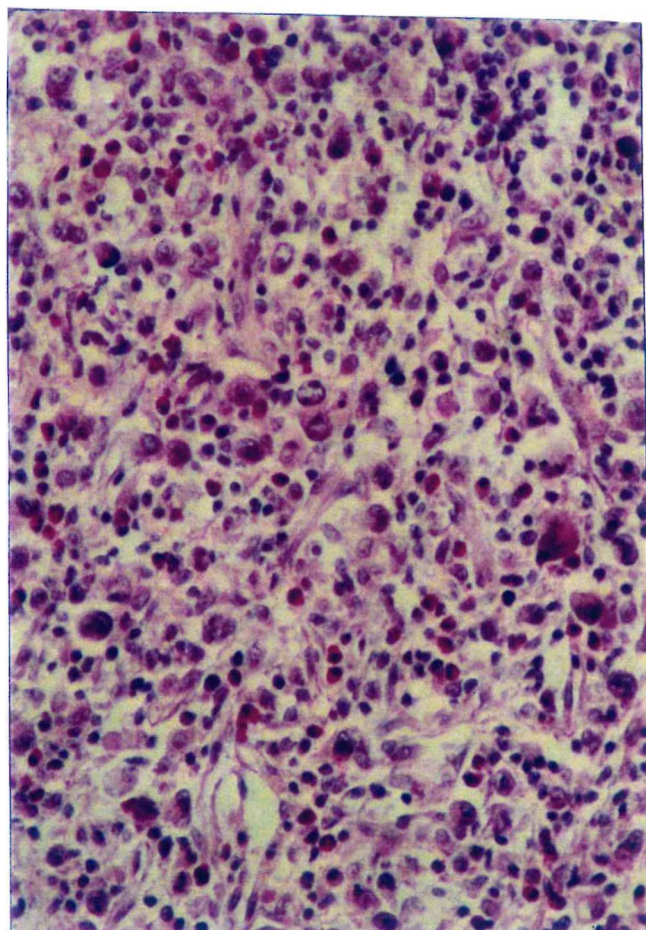


Figura 1: Doença de Hodgkin: subtipo celularidade mista. Caso 36. Aumento 10X. Hematoxilina-eosina (HE).

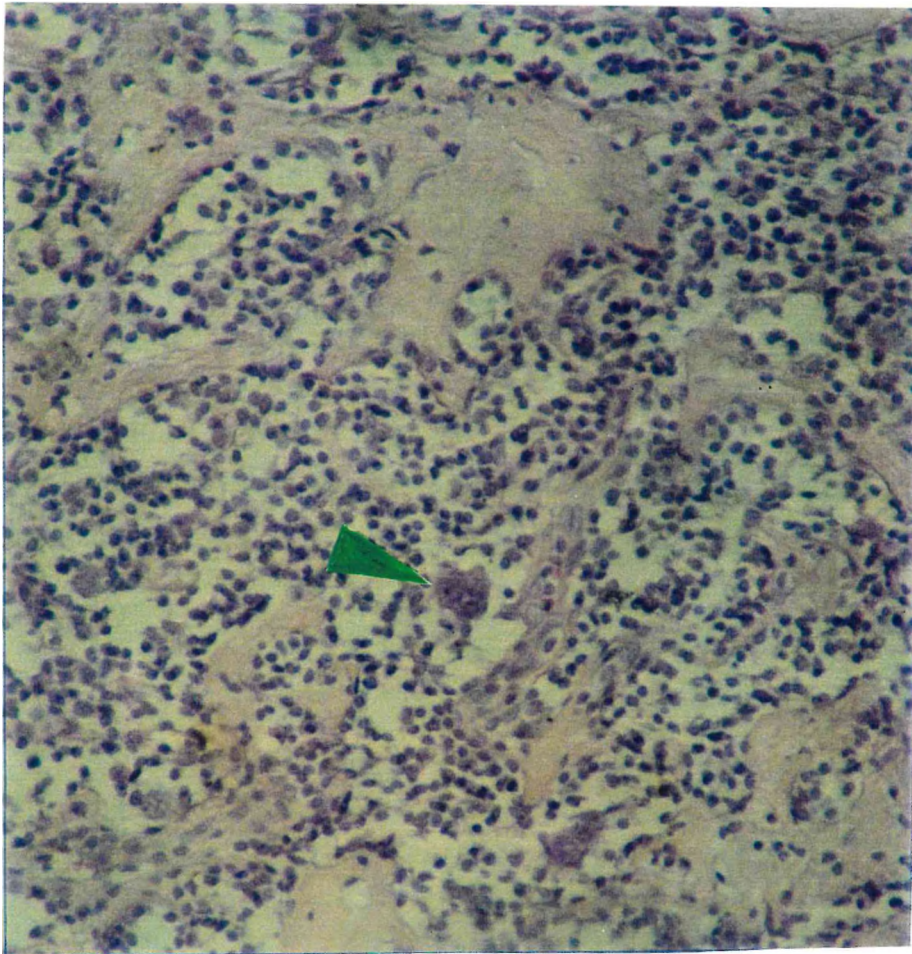


Figura 2: Doença de Hodgkin: subtipo depleção linfocitária. Caso 35. Aumento 10X. HE. Seta indicando cél. RS.

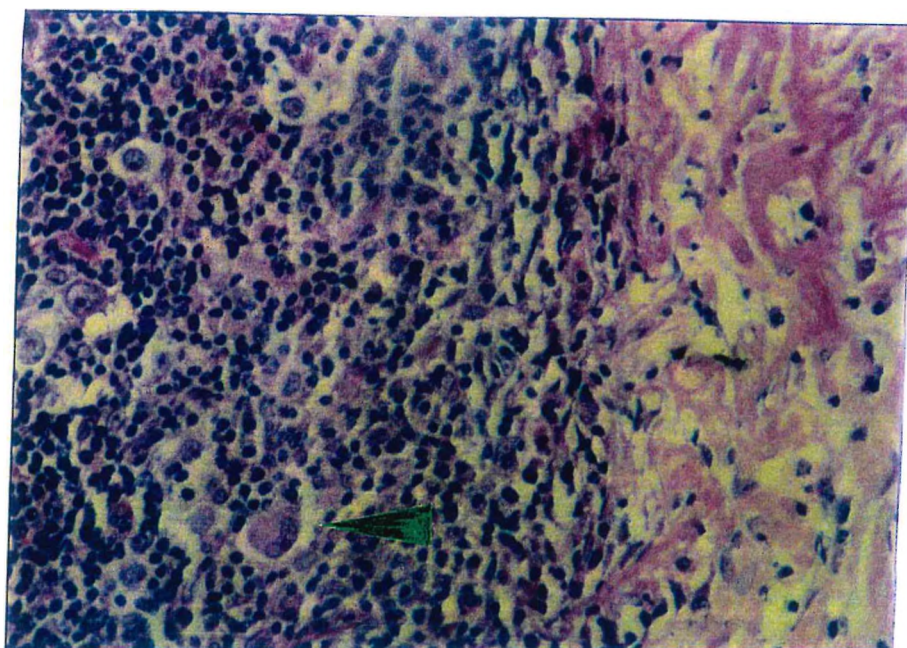


Figura 3: Doença de Hodgkin: subtipo esclerose nodular. Caso 49. Aumento 10X. HE. Seta indicando cél. Lacunar.

Quadro 01. Amostra de pacientes com DH no Ceará 1985-96.

Caso	Sexo	Idade(anos)	Subtipo histológico	Localização anatômica
1.	M	16	DHCM	Cervical
2.	M	6	DHCM	Cervical
3.	M	11	DHCM	Cervical
4.	M	11	DHCM	Cervical
5.	M	15	DHEN	Axilar
6.	M	11	Não classificado	Cervical
7.	F	16	DHEN	Cervical
8.	M	16	DHEN	Supraclavicular
9.	M	8	DHCM	Cervical
10.	M	8	DHCM	Retroperitoneal.
11.	F	8	DHCM	Cervical
12.	F	8	DHCM	Cervical
13.	F	14	DHEN	Cervical/Axilar
14.	M	15	DHEN	Cervical
15.	M	5	DHCM	Cervical
16.	M	12	DHCM	Cervical
17.	F	2	DHCM	Cervical
18.	M	6	DHCM	Cervical
19.	F	12	DHCM	Cervical
20.	F	7	DHCM	Cervical
21.	F	5	DHCM	Inguinal
22.	F	16	DHEN	Axilar
23.	M	5	DHEN	Cervical
24.	M	5	DHCM	Cervical
25.	F	15	DHEN	Inguinal/axilar/cervical
26.	F	17	DHEN	Supraclavicular
27.	F	8	DHCM	Cervical
28.	F	6	DHEN	Cervical
29.	F	12	DHCM	Axilar
30.	F	10	DHCM	Cervical
31.	F	9	DHCM	Axilar
32.	M	7	DHCM	Cervical
33.	F	10	DHCM	Cervical
34.	M	5	DHDL	Cervical
35.		36	DHDL	Cervical
36.	M	38	DHCM	Epitroclear
37.	M	48	DHCM	Inguinal
38.	F	32	DHEN	Cervical
39.	M	28	DHEN	Cervical
40.	F	41	DHEN	Axilar
41.	M	57	DHCM	Cervical
42.	M	39	DHEN	Cervical
43.	M	36	DHCM	Axilar
44.	F	50	DHCM	Abdominal
45.	F	43	DHEN	Cervical
46.	F	21	DHEN	Cervical
47.	F	48	DHEN	Mediastino
48.	M	35	DHDL	Axilar
49.	M	25	DHEN	Cervical
50.	F	42	DHCM	Cervical

Quadro 02. Amostra de pacientes com linfonodos reacionais, maiores de 18 anos, Ceará 1992-96

Caso	Registro	Sexo	Idade (anos)	Localização anatômica
01	765/92	M	42	Cervical
02	3146/92	F	32	Cervical
03	4510/92	M	21	----
04	2029/94	F	58	Cervical
05	3435/94	M	26	Inguinal
06	3656/94	F	48	----
07	5420/94	F	37	Cervical
08	5674/94	M	26	Axilar
09	6165/94	F	26	Cervical
10	6657/94	M	74	Axilar
11	7140/94	M	29	Cervical
12	137/95	F	39	Cervical
13	143/95	M	19	Axilar
14	2047/95	F	24	Cervical
15	3754/95	F	52	Inguinal
16	5566/95	M	78	Abdominal
17	5744/95	M	55	Retroperit.
18	184/96	F	20	----
19	3416/96	F	20	Cervical
20	3934/96	F	47	Mediastino
21	5215/96	F	62	----

Legenda: M- masculino; F- feminino

Quadro 03. Amostra de pacientes com Linfoma não-Hodgkin, Ceará – 1993-96

Caso	Registro	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico histológico
01	1600/93	M	58	LNH Centrocítico
02	3096/93	M	15	LNH Centrocítico
03	3770/93	M	35	LNH
04	5477/93	F	48	LNH linfocítico
05	1437/94	M	68	LNH?
06	2472/94	M	56	LNH?
07	3038/94	F	20	LNH
08	4482/94	M	23	Micose fungóide?
09	5178/94	F	69	LNH
10	6020/94	M	60	LNH?
11	637/95	M	67	LNH?
12	2220/95	F	27	LNH?
13	4225/95	M	73	LNH centrocítico
14	5289/95	M	73	LNH CBCC?
15	6039/95	M	66	LNH centrocítico?
16	7533/95	F	64	LNH CBCC
17	44/96	M	45	LNH
18	8378/96	F	28	LNH CBCC
19	15394/96	M	----	LNH anaplásico

Legenda : M- masculino, F- feminino; LNH – linfoma não-Hodgkin

Quadro 04. Casos do grupo da DH positivos para o EBV, no Ceará, 1985 a 1996.

Caso	Sexo	Idade	Subtipo histológico	Localização Anatômica	HIS/EBV
1	M	16	DHCM	Cervical	Positivo
2	M	6	DHCM	Cervical	Positivo
3	M	11	DHCM	Cervical	Positivo
4	M	11	DHCM	Cervical	Positivo
5	M	15	DHEN	Axilar	Positivo
6	M	11	Não classificado	Cervical	Positivo
7	F	16	DHEN	Cervical	Positivo
9	M	8	DHCM	Cervical	Positivo
10	M	8	DHCM	Retroperitoneal	Positivo
11	F	8	DHCM	Cervical	Positivo
12	F	8	DHCM	Cervical	Positivo
13	F	14	DHEN	Cervical/Axilar	Positivo
15	M	5	DHCM	Cervical	Positivo
16	M	12	DHCM	Cervical	Positivo
17	F	2	DHCM	Cervical	Positivo
18	M	6	DHCM	Cervical	Positivo
19	F	12	DHCM	Cervical	Positivo
20	F	7	DHCM	Cervical	Positivo
21	F	5	DHCM	Inguinal	Positivo
23	M	5	DHEN	Cervical	Positivo
24	M	5	DHCM	Cervical	Positivo
27	F	8	DHCM	Cervical	Positivo
28	F	6	DHEN	Cervical	Positivo
29	F	12	DHCM	Axilar	Positivo
30	F	10	DHCM	Cervical	Positivo
31	F	9	DHCM	Axilar	Positivo
32	M	7	DHCM	Cervical	Positivo
33	F	10	DHCM	Cervical	Positivo
34	M	5	DHDL	Cervical	Positivo
37	M	48	DHCM	Inguinal	Positivo
39	M	28	DHEN	Cervical	Positivo
41	M	57	DHCM	Cervical	Positivo
44	F	50	DHCM	Abdominal	Positivo
47	F	48	DHEN	Mediastino	Positivo
49	M	25	DHEN	Cervical	Positivo

Legenda : M- masculino; F- feminino; HIS – Hibridização *in situ*; EBV-vírus de Epstein-Barr; DHCM- Doença de Hodgkin subtipo celularidade mista; DHEN – Doença de Hodgkin subtipo esclerose nodular

Quadro 05 Pesquisa do EBV no grupo formado por linfonodos reacionais, no Ceará entre 1992 a 1996.

Caso	Registro	Sexo	Idade (anos)	Localização Anatômica	HIS/EBV
01	765/92	M	42	Cervical	negativo
02	3146/92	F	32	Cervical	negativo
03	4510/92	M	21	----	negativo
04	2029/94	F	58	Cervical	negativo
05	3435/94	M	26	Inguinal	negativo
06	3656/94	F	48	----	negativo
07	5420/94	F	37	Cervical	negativo
08	5674/94	M	26	Axilar	negativo
09	6165/94	F	26	Cervical	negativo
10	6657/94	M	74	Axilar	negativo
11	7140/94	M	29	Cervical	negativo
12	137/95	F	39	Cervical	negativo
13	143/95	M	19	Axilar	negativo
14	2047/95	F	24	Cervical	negativo
15	3754/95	F	52	Inguinal	negativo
16	5566/95	M	78	Abdominal	negativo
17	5744/95	M	55	Retroperit.	negativo
18	184/96	F	20	----	negativo
19	3416/96	F	20	Cervical	negativo
20	3934/96	F	47	Mediastino	negativo
21	5215/96	F	62	----	negativo

Legenda: M- masculino; F- feminino; HIS- Híbridização *in situ*,
EBV- vírus de Epstein-barr

Quadro 06. Pesquisa do EBV no grupo de linfomas não-Hodgkin, no Cerá entre 1993 e 1996.

Caso	Registro	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico histológico	HIS/EBV
01	1600/93	M	58	LNH Centrocítico	negativo
02	3096/93	M	15	LNH Centrocítico	negativo
03	3770/93	M	35	LNH	negativo
04	5477/93	F	48	LNH linfocítico	negativo
05	1437/94	M	68	LNH?	negativo
06	2472/94	M	56	LNH?	negativo
07	3038/94	F	20	LNH	negativo
08	4482/94	M	23	Micose fungóide?	negativo
09	5178/94	F	69	LNH	negativo
10	6020/94	M	60	LNH?	negativo
11	637/95	M	67	LNH?	negativo
12	2220/95	F	27	LNH?	negativo
13	4225/95	M	73	LNH centrocítico	negativo
14	5289/95	M	73	LNH CBCC?	negativo
15	6039/95	M	66	LNH centrocítico?	negativo
16	7533/95	F	64	LNH CBCC	negativo
17	44/96	M	45	LNH	negativo
18	8378/96	F	28	LNH CBCC	negativo
19	15394/96	M	---	LNH anaplásico	negativo

Legenda : M- masculino, F- feminino; LNH – linfoma não-Hodgkin
 HIS – Híbridização *in situ*; EBV – vírus de Epstein-Barr

Quadro 07. Distribuição dos pacientes com doença de Hodgkin, por IDH, sexo, subtipo histológico e positividade para o EBV no Ceará e em regiões selecionadas.

País/Estado	IDH	Sexo		Subtipo Histológico(EBV)					Casos Positivos(EBV)					Nº casos		
		M	F	C M	EN	PL	DL	Ou t	C M	EN	PL	DL	Ou t	Tot	Inf	Ad
1-Honduras	0,575	6	5	6	3	1	---	1	6	3	1	---	1	11	11	--
2-EUA	0,942	1 2	1 3	7	15	2	---	1	6	2	---	---	1	9	25	--
3-Quênia	0,468	--	--	18	64	5	9	---	18	51	4	7	---	85	53	48
4-Argentina	0,884	3 2	9	25	9	6	1	---	19	---	2	1	---	22	41	--
5-Peru	0,717	2 5	7	20	7	1	4	---	20	7	1	2	---	30	20	12
6-Reino Unido	0,931	--	--	7	12	1	2	---	7	4	---	2	---	13	22	--
7-Arábia Saudita	0,774	--	--	5	2	1	---	---	5	2	---	---	---	7	8	--
8-São Paulo	0,850	--	--	12	10	2	1	---	10	7	---	1	---	18	25	--
9-Ceará	0,506	1 8	1 6	22	10	---	1	1	22	5	---	1	1	29	34	--
10-Israel	0,913	6 4	4 2	33	64	9	---	---	15	14	---	---	---	29	11	95
11-Coréia	0,890	6 8	1 9	51	64	8	11	---	38	10	5	7	---	60	16	71
12-Malásia	0,832	?	?	31	33	14	2	---	27	12	---	1	---	40	15	52
13-México	0,853	--	--	23	8	---	---	---	20	4	---	---	---	24	--	31
14-Costa Rica	0,889	--	--	4	10	---	---	---	3	2	---	---	---	5	--	14
15-EUA	0,942	--	--	21	53	---	---	---	14	13	---	---	---	27	--	74
16-Ceará	0,506	9	7	6	8	0	2	0	3	3	0	0	0	6	--	16

Legenda: M-masculino, F-feminino, Out-outros, Tot-total, Inf-Infante juvenil, Ad-adulto

TÉCNICA DA REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* (HIS)

1. *Sonda DNA*: O procedimento para a hibridização *in situ* foi realizado utilizando sonda DNA de oligonucleotídeo de 30 bases, complementar ao segmento do gene EBER1, região do genoma do EBV que é ativamente transcrito (até 10^7 cópias por célula) em células latentemente infectadas (Glickman et al., 1988). A sonda de oligonucleotídeo foi fornecida pelo Dr. Lawrence M. Weiss, e foi produzida e biotinizada de acordo com método classicamente descrito na literatura (Weiss et al., 1991). A seqüência de nucleotídeos da sonda de EBV é a seguinte: 5' AGA CAC CGT CCT CAC CAC CCG GGA CTT GTA 3.

2. *Pré-tratamento*: Os cortes histológicos foram colocados sobre lâminas de vidro pré-tratadas com adesivo Poli-D-lisina (Catálogo N° P7886, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, EUA) e incubados em estufa a 60°C por 24 horas. A seguir, os cortes foram desparafinizados e hidratados de maneira rotineira. Posteriormente, a peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada, incubando os cortes com solução de H₂O₂ a 3% por 10 minutos. A digestão enzimática foi realizada com proteinase K (Catálogo N° 25530-015, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EUA) na concentração de 1ul/ml em solução Tris-EDTA, e o bloqueio da atividade enzimática com solução de glicina (Catálogo N° 15527-013, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, EUA) na concentração de 2mg/ml por 10 minutos. A seguir, os cortes foram desidratados em álcool a 95%, com posterior secagem ao ar ambiente.

3. *Pré-hibridização e hibridização*: Solução de pré-hibridização (Weiss & Chen, 1991), 60 minutos a 37°C; aplicação da sonda específica de DNA do EBV sobre os cortes e hibridização em câmara úmida a 37°C *overnight*.

4. *Coloração e montagem*: Visualização da hibridização através do método ABC utilizando anticorpo antibiotina na diluição de 1: 100 (Catálogo n° SP3000, Vector Corp., Burlingame, CA, EUA) e revelação utilizando solução de DAB, conforme especificado acima em método imunohistoquímico; contra-coloração com verde de metila e desidratação em gradientes sucessivos de álcool com posterior montagem das lamina em Permout™ (Catálogo N°

SO-P-15, Fisher Scientific, Fair Law, New Jersey, EUA).

Em todos os passos necessários e na esterelização de material não autoclavável, utilizou-se solução saline com água destilada e purificada contendo RNase AWAYrM (Catálogo N° 7000, Molecular BioProducts Inc., San Diego, Califórnia, EUA), a 0,1%. A manipulação de todo o material foi realizado com luvas. Estas precauções tiveram como objetivo principal evitar a ação da RNase, eventualmente presente nas vidrarias utilizadas.

8. SUMMARY

Many studies have shown that Hodgkin's disease (HD) is associated with Epstein-Barr virus (EBV) in a substantial number of cases, and that in these cases EBV DNA is localized exclusively in Reed-Sternberg (RS) cells. In the present study, we carried out an analytic analysis in a sample with 50 HD cases from Ceara, Northeast Brazil. The sample was divided in two main groups: group aged less than 18 years old (infant-juvenile) and group aged more than 18 years old (adult).

Chi-square (X^2) test was performed to analyse the possible relation of EBV in each age group with the histopathologic subtypes of HD.

The possible correlation between economic development and positiveness for EBV was also evaluated. For this purpose, data from 15 different geographic and economic areas were analysed using the Spearman coefficient. The development was evaluated according to the Human Development Rate.

The results suggest a strong association between EBV and HD in Ceara state. It is more evident in the infant-juvenile group and in the subtype mixed cellularity. Besides, it shows an inverse relationship between regional development and positiveness into HD sample.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 (Mestrado em Patologia)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, 1996.
- AMBINDER, R.F. et al. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. **Blood**, v.81, p.462-467, 1993.
- ANAGNOSTOPOULOS, I. et al. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. **Blood**, v.74, p.810-816, 1989.
- ANDREESEN, R. et al. Human macrophages can express the Hodgkin's cell-associated antigen Ki-1 (CD30). **Am. J. Pathol**, v.134, p. 187-192,1989.
- ARMSTRONG, AA et al. The expression of the EBV latent membrane protein (LMP-1) is independente of CD 23 and bcl-2 in Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. **Histopathol.**, v. 21, p. 72-73, 1992.
- ARMSTRONG, A.A. et al. Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v.142, p.1683-1688,1993.
- ARMSTRONG, A.A. et al. Criteria for the definition of Epstein-Barr virus association in Hodgkin's disease. **Leukemia**, v. 6, p. 869-874, 1992.

BANKS, P.M. The pathology of Hodgkin's disease. **Semin. Oncol.**,v.17, P.683-695,1990.

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

BENHARROCH, D. et al. Association of the Epstein-Barr virus with Hodgkin's disease in southern Israel. **Int. J. Cancer**, v. 71, p.138-141, 1997.

BROUSSET, P. Detection of Epstein-Barr virus messenger RNA in reed-sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with biotinylated probes on specially processed modified acetone methyl benzoate xylene (modamex) sections. **Blood**, v. 77, p. 1781-1786, 1991.

CHANDRA, R. K., KUMARI, S. Effects of nutrition on the immune system. **Nutrition** v. 10, p. 207-210, 1994.

CHANG, K.L. et al. High prevalence of Epstein-Barr virus in the ReedSternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. **Blood**, v. 81, p.496-501, 1993.

COLLINS, RH Jr. The pathogenesis of Hodgkin's disease. **Blood Rev.**, v. 4, p. 61-68,1990.

CONNELLY, R.R., CRISTINE, B. W. A cohort study of cancer following infectious mononucleosis. **Cancer Res.**, v. 34, p. 1172-1178, 1974.

CONTRAN, R. S. **Robbins pathologic basis of disease**. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. cap. 4, p. 629-672.

CORREA, P., O'CONOR, T.O. Epidemiologic patterns of hodgkin's disease. **Int. J. Cancer**, v. 8, p. 192-201, 1971.

- DeVITA & ULTMANN. Doença de Hodgkin e os linfomas linfocíticos. In: BRAUNWALD, E. et al. **Harrison Medicina Interna**, 11.ed, Guanabara, 1988. v. 2, cap. 294.
- DIEHL, V. et al. The cell of origin in Hodgkin's disease. **Semin. Oncol.**, v. 17, p.660-672,1990.
- DIEHL, V. et al. Phenotypic and genotypic analysis of Hodgkin's disease derived cell lines: histopathological and clinical implications. **Cancer Surv.**, v. 4, p.390, 1985.
- DOLCETTI, R. et al. Epstein-Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the italian population and high association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease. **Blood**, v. 89, p. 1723-1721, 1997.
- DOLCETTI, R. et al. Identification and characterization of an Epstein-Barr virus-specific t-cell response in the pathologic tissue of a patient with Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, v. 54, p. 3675-3681, 1995.
- DREXLER, H.G. et al. Is the Hodgkin cell a T- or a B-lymphocyte? Recent evidence from genotypic and immunophenotypic analysis and in vitro cell lines. **Hematol. Oncol.**, v.7, p. 95-113, 1989.
- EVANS, A.S. et al. A case-control study of Hodgkin's disease in Brazil. II. Seroepidemiologic studies in cases and family members. **Am. J. Epidemiol.**, v. 112, p. 609-618, 1980.
- EVANS, A.S., GUTENSOHN, N.M. A population-based case-control study of EBV and other viral antibodies among persons with Hodgkin's disease and their siblings. **Int. J. Cancer**, v. 34, p.149-157, 1984.
- EYRE, H. Hodgkin's disease. In: LEE, G. R. et al . **Wintrobe's clinical hematology**. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 79, p. 2054-2081.

- FERREIRA, F.V.A., MENEZES, D.B. Doença de Hodgkin - Interrelação linfócitos - "células alvo", como índice morfológico do prognóstico. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v.17, p. 19-23, 1977.
- 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.
- FRISAN, T. et al. Local supression of Epstein-Barr virus (EBV)- specific cytotoxicity in biopsies of EBV- positive Hodgkin's disease. **Blood**, v. 86, p. 1493-1501, 1995.
- GLASER, S.L., et al. Epstein-Barr virus - associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. **Int. J. Cancer**, v. 70, p. 375-382, 1997.
- GULLEY, M. L. 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.
- GUTENSOHN, N., COLE, P. Epidemiology of Hodgkin's disease in the young. **Int. J. Cancer**, v. 19, p.595-604, 1977.
- _____. Epidemiology of hodgkin's disease. **Sem.Oncol.**, v. 17, p. 92-102, 1980.
- _____. Childhood social environment and Hodgkin's disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 304, p.435-440, 1981.
- HALUSKA, F.G., BRUFISKY, A.M., CANELLOS, G.P. The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. **Blood**, v.84, p.1005-1019, 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.

HERBST, H. et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and reed-sternberg cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88. p. 4766-4770, 1991.

HERBST, H. et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. **Blood**, v. 87, p. 2918-2929, 1996.

HOFFBRAND, A.V., PETIT, J.E. **Hematologia clínica ilustrada – Manual e atlas colorido**. São Paulo, Editora Manole, 1991.p.10.2, 10.4, 10.5.

HSU S.M. The never-ending controversies in Hodgkin's disease. **Blood**, v. 75, p.1742-1744, 1990.

HUH, J. et al. A pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with the Epstein-Barr virus infection. **Cancer**, v. 77, p. 949:955, 1996.

HUMMEL, M. et al. Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells. **N. Engl. J. Med.**, v.333, p.901-906, 1995.

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

KHAN, G. et al. Epstein-Barr virus infection and *bcl-2* proto-oncogene expression – Separate events in the pathogenesis of Hodgkin's disease? **Am. J. Pathol.**, v. 143, n. 5, p. 1270-74, 1993.

KHANNA, R. et al. **Immune regulation in Epstein-Barr virus - associated diseases**. Microbiol. reviews. p 387-405. 1995.

KIEFF, E. Epstein-barr virus and its replication. In: FIELDS, B.N. et al. **Fundamental virology**.

3.ed. Philadelphia: Raven Press, 1996. cap. 33, p. 1109-1162.

KUPPERS, R. et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Stenberg cells picked from histological sections show clonal immune globulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stage; of development. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 10962-10966, 1994.

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

LISTER, T.A., CROWTHER, D. Staging for Hodgkin's disease. **Sem. Oncol.**, v. 17, p.696-703, 1990.

LISTER, T.A. et al. Report of a Committee Convened To Discuss the Evaluation and Staging of Patients with Hodgkin's Disease: Cotswolds Meeting. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, p. 1630-1636, 1989.

MACMAHON, B. Epidemiology of Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, v. 26, p. 1189-1200, 1966.

MILLER, G. The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. **J. Infect. Dis.**, v. 161, p. 833-844, 1990.

MUELLER, N., et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus - altered antibody pattern before diagnosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, p. 689-695, 1989.

MURRAY, P. et al., **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 38, p. 323-345.

OERTEL, J. et al. Immunocytochemical analysis of lymph node aspirates in patients with human immunodeficiency virus infection. **J. Clin. Pathol.**, v. 43, p. 844-846, 1990.

- PALLESEN, G. et al. Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Blood**, v.78, p. 1162-1165, 1991.
- PALLESEN, G. et al. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. **Lancet**, v.337, p.320-322, 1991.
- PEH, S.C., LOOI, L.M.,PALLESEN, G. Epstein-Barr virus (EBV) and Hodgkin's disease in a multi-ethnic population in Malaysia. **Histopathology**, v. 30, p. 227-233, 1997.
- PITOMBEIRA, M. S. et al. Doença de Hodgkin na infância e na adolescência. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v.42, p.253-259, 1987.
- POPPEMA, S et al. The typical Reed-Sternberg phenotype and Ig gene rearrangement of Hodgkin's disease derived cell line ZO indicating a B-cell origin. **Recent. Results Cancer Res.** v.117, p. 67-74,1989.
- POPPEMA, S. et al. Lymphadenopathy morphologically consistent with Hodgkin's disease associated with Epstein-Barr virus infection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.84, p.385-390, 1985.
- PRECIADO, M.V. et al. Presence of Epstein-Barr virus and strain type assignment in argentine childhood Hodgkin's disease. **Blood**, v. 86, p.3922-3929, 1995.
- RAPPAPORT, S. I. **Introdução à hematologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1990. cap. 19, p. 264-274.
- RAPPAPORT, H. et al. Report of the Committee on Histopathological Criteria Contributing to Staging of Hodgkin's Disease. **Cancer Res.**, v. 31, p. 1864. 1971.
- RAZZOUK, B. I. 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.

RIGGS, A.S, FULLER L.M. Evaluation and differential diagnosis of the patient with Hodgkin's disease or non-Hodgkin's Lymphoma. In: **Hodgkin's Disease and NonHodgkin's lymphomas in adults and children**. New York: Raven Press,1988.

ROSDAHL, N. et al. Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. **Br. Med. J.**, v. 2, p. 253-256, 1974.

ROSENBERG, S.A. Classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 84, p. 1359-1360, 1994.

SCHAADT, M .et al: Biology of Hodgkin cell lines. **Recent Results Cancer Res.**, v. 117, p.53-61,1989.

SCHOOLEY, R. T. Epstein-Barr virus (infectious mononucleosis). In: MANDELL, D. and BENNETT'S. **Principles and practice of infectious disease**. 4.ed. Churchill Livingstone, 1995. cap 118, p. 1364-1376.

SING, A. P. et al. Isolation of Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific Cytotoxic T Lymphocytes That Lyse Reed-Sternberg Cells: Implications for Immune-Mediated Therapy of EBV+ Hodgkin's disease. **Blood**, v. 89, p. 1978-1986, 1997.

SITAR, G. et al. Isolation of Reed-Stenberg cells from lymph nodes of Hodgkin's disease patients. **Blood**, v. 73, p. 222-229, 1989.

SLIVNICK, D. J. et al. The impact of hodgkin's disease on the immune system. **Semin. Oncol.**, v. 17, p.673-682, 1990.

SRIGLEY, J. et al. Heterogeneity of non-Hodgkin's lymphoma probed by nucleic acid cytometry. **Blood**, v.65, p. 1090,1985.

- STEIN, H. Hodgkin's disease. In: Proposed World Health Organization classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 21, n.1, p.119-121, 1997.
- STRUM, S.B., PARK, J.K., RAPPAPORT, H. Observation of cells resembling Sternberg-Reed cells in conditions other than Hodgkin's disease. **Cancer**, v. 26, p. 176, 1970.
- SUNDEEN, J. et al. Rearranged antigen receptor genes in Hodgkin's disease. **Blood**, v. 70, p. 96-103, 1987.
- TAO, Q. et al. Lack of correlation between expression of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein and *bcl-2* oncoprotein in vivo. **Clin. Pathol.**, v. 47, p. 589-91, 1994.
- TILLY, H. et al. Cytogenetic studies in untreated Hodgkin's disease. **Blood**, v. 77, p. 1298-1304, 1991.
- VASEF, M.A. et al. Detection of Epstein-Barr virus in multiple sites involved by Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p.1408-1415, 1995.
- YAWATA, Y. **Atlas of blood diseases: cytology and histology**. London, Martins Dunitz, 1996. p. 141.
- WEINREB, M. et al. The consistent association between Epstein-Barr virus Hodgkin's disease in children in Kenya. **Blood**, V. 87, p.3828-3836, 1996.
- WEISS, L.M. et al. Detection of Epstein-Barr viral genomes in ReedSternberg cells of Hodgkin's disease. **N. Engl. J. Med.**, v.320, p. 502-506, 1989.
- WEISS, L.M. et al. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v.

129, p. 86-91, 1987.

WEISS, L.M. et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v. 139, p.1259-1265, 1991.

WRIGHT, D.H. Pathology of Hodgkin's disease: anything new?, **Recent Results Cancer Res.**, v. 117, p. 3-13, 1989.

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. Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Int. J. Cancer**, v. 46, p. 801-804, 1990.