



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÉLULAS B NO  
DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DE HODGKIN**

**JORGE RABELO DE SOUSA**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2003**

l:577.27



001715

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Dissertação de Mestrado**

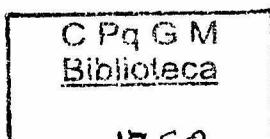
**MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÉLULAS B NO DIAGNÓSTICO DE  
LINFOMA DE HODGKIN**

**JORGE RABELO DE SOUSA**

Orientadora: Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Patologia para obtenção do grau  
de mestre em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia – Brasil  
2003



Ficha Catalográfica elaborada pela  
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Sousa, Jorge Rabelo  
S725m Marcadores imunoistoquímicos de células B no diagnóstico de  
Linfoma de Hodgkin [manuscrito] / por Jorge Rabelo Sousa. – 2004.  
94 f. : il. ; 29 cm

Datilografado (fotocópia)

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de  
Medicina . Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

Orientador: Profa. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo,  
Laboratório de Patologia e Imunoistoquímica do Hospital Universitário  
Professor Edgar Santos.

1. Linfoma de Hodgkin. 2. Imunoistoquímica. 3. Diagnóstico  
diferencial. Título.

CDU 616-006.44:577.27

616.44

PHL  
MTN 1358  
001715

616-006.44:577.27  
S725m

MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÉLULAS B NO DIAGNÓSTICO  
DE LINFOMA DE HODGKIN

**JORGE RABELO DE SOUSA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Maria da Glória da Mota Bomfim  
Arruda  
Professora Adjunta  
FAMED - UFBA



---

Dr. Eduardo Antônio G. Ramos  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



---

Dra. Iguaracyra Barreto Oliveira Araújo  
Professora Adjunta  
FAMED - UFBA

Aos meus pais, Antônio e Alda,  
À minha querida esposa, companheira e amiga Cris,  
Ao meu adorável filho Iuri, que iluminam os meus dias.  
E aos meus irmãos.

## AGRADECIMENTOS

Nas linhas dessa dissertação há um presente de minha esposa, Cris, e de nosso filho, Iuri: o tempo, o espaço e a liberdade para escrever, e o incentivo de começar novamente.

Agradeço especialmente a Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo, por ter aceitado a minha orientação e pela oportunidade de convivência e aprendizagem.

À Dra. Achiléa Lisboa Bittencourt pela orientação e por disponibilizar quase todos os materiais necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Harald Stein, chefe do Instituto de Patologia do Hospital Universitário Benjamin Franklin der Für-Berlin, por ter cedido anticorpos (Ber-H2, Oct-2, BOB.1 e BSAP) utilizados neste estudo.

À Maria das Graças Vieira pelo treinamento da técnica de imunoistoquímica e pela boa convivência e amizade.

À Dra. Helenemarie Schaer Barbosa pelas críticas e sugestões.

À Juçara Maria Andrade de Souza e demais membros do Serviço de Anatomia Patológica do HUPES pelo acolhimento e carinho no cotidiano.

À Lourdes Santos da Silva que cortou todas os blocos com extrema competência e bom humor.

À Célia de Abreu Ribeiro pelo apoio durante a coleta de informação e material nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Martagão Gesteira.

Aos meus colegas de curso pela oportunidade de convivência e aprendizagem e ao excelente convívio.

À Rosália Meire, pelo incentivo e apoio durante todo o curso, principalmente nos momentos críticos.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz pela oportunidade de realizar este curso.

Ao meu amigo Odilon Oliveira da Silva pelas palavras de apoio e estímulo durante o curso.

À minha amiga, Dra. Angélica Maria Araújo Côrrea, responsável pela orientação dos meus primeiros passos no mundo da pesquisa.

À diretoria, colegas e funcionários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador pelo apoio nessa jornada.

Aos meus queridos alunos pela paciência e compreensão durante os dois anos de curso.

À Ana Christina C. Campos e Ana Fiscina V. Sampaio, pela ajuda na organização das referências bibliográficas, e normalização dessa dissertação.

*“Ao iniciarmos com certezas, terminaremos em dúvidas; mas, se iniciarmos com dúvidas e formos persistentes, encontraremos as certezas”.*

FRANCIS BACON (1561-1626)

*“Nossas dúvidas são traiçoeiras,  
E nos fazem perder todo o benefício que poderíamos conquistar,  
Por temermos tentar”.*

WILLIAM SHAKESPEARE (1464-1616)

(Medida por Medida, liv, linha 77)

## SUMÁRIO

	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	9
	LISTA DE ABREVIATURAS....	10
	RESUMO.....	12
	ABSTRACT.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	LINFOMA DE HODGKIN.....	16
2.1.1	Histórico.....	16
2.1.2	Conceito.....	17
2.1.3	Epidemiologia.....	18
2.1.4	Classificação histopatológica.....	20
2.1.5	Tipos histopatológicos dos linfomas de Hodgkin.....	22
2.1.5.1	<u>Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica (LHPL)</u> .....	22
2.1.5.2	<u>Linfoma de Hodgkin clássico (LHC)</u> .....	24
2.1.5.2.1	<i>Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos (LHCRL)</i> .....	24
2.1.5.2.2	<i>Linfoma de Hodgkin esclerose nodular (LHEN)</i> .....	24
2.1.5.2.3	<i>Linfoma de Hodgkin celularidade mista (LHCM)</i> .....	26
2.1.5.2.4	<i>Linfoma de Hodgkin depleção linfocítica (LHDL)</i> .....	27
2.1.6	Alterações genéticas e moleculares em LH.....	28
2.2	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO LINFOMA DE HODGKIN.....	32
2.3	LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES.....	33
2.4	LINFOMA DE HODGKIN E LACG .....	35
2.5	MARCADORES DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO.....	36
2.5.1	CD30.....	36
2.5.2	CD15.....	38
2.6	ORIGEM DA CÉLULA NEOPLÁSICA DO LINFOMA DE HODGKIN.....	38
2.7	ORIGEM DA CÉLULA DE RS EM LINFÓCITOS B.....	39
2.8	MARCADORES DE CÉLULAS B DE SUPERFÍCIE EM LH.....	40
2.8.1	Imunoglobulinas.....	40
2.8.2	CD20 e CD79a.....	40
2.9	FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	41
2.9.1	Oct-2, BOB.1.. ..	41
2.9.2	BSAP.....	42
3	OBJETIVOS .....	44
3.1	GERAL.....	44
3.2	ESPECÍFICOS.....	44
4	JUSTIFICATIVA.....	45
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	47
5.2	MATERIAL.....	47
5.2.1	Anticorpo.....	48
5.3	MÉTODO.....	48
5.3.1	Estudo imunoistoquímico.....	48
5.3.1.1	<u>Preparo de lâminas</u> .....	48
5.3.1.2	<u>Técnica</u> .....	49
5.3.1.3	<u>Interpretação das reações de imunoistoquímica</u> .....	51

<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
6.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	53
6.2	ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	54
6.3	ASPECTOS IMUNOISTOQUÍMICOS.....	55
6.4	LINFOMAS DE HODGKIN CLÁSSICO.....	56
<b>6.4.1</b>	<b>Expressão de CD30 em LH clássico.....</b>	<b>58</b>
6.5	EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO LINFÓIDE B EM LH CLÁSSICO.....	59
<b>6.5.1</b>	<b>Expressão de CD20.....</b>	<b>59</b>
<b>6.5.2</b>	<b>Expressão de BSAP.....</b>	<b>62</b>
6.6	LINFOMA DE HODGKIN PREDOMINÂNCIA LINFOCÍTICA.....	63
<b>6.6.1</b>	<b>Expressão de marcadores de diferenciação linfóide B (CD20) em LHPL.....</b>	<b>64</b>
<b>6.6.2</b>	<b>Expressão dos marcadores linfóides B, Oct-2 e BOB.1 em LHP.....</b>	<b>65</b>
6.7	LINFOMA NÃO HODGKIN: LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES.....	66
6.8	CASO NÃO CLASSIFICADO IMUNOFENOTIPICAMENTE.....	67
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
7.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	68
7.2	LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO.....	69
7.3	EXPRESSÃO DE MARCADORES B EM LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO.....	71
7.4	LINFOMA DE HODGKIN PREDOMINÂNCIA LINFOCÍTICA.....	72
7.5	LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES.....	73
7.6	CORRELAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS COM O ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	74
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Organograma da metodologia aplicada.....	49
Figura 2. Distribuição do total de casos estudados por sexo.....	53
Figura 3. Distribuição do total de casos estudados por faixa etária diagnóstico inicial.....	53
Figura 4. Organograma comparativo de diagnóstico .....	56
Figura 5. Aspectos morfológicos dos subtipos de linfoma de Hodgkin clássico .....	57
Figura 6. Distribuição dos 93 casos de LH clássico quanto ao subtipo histológico após IHQ.....	58
Figura 7. Expressão de CD30 em LH clássico .....	59
Figura 8. Expressão de CD20 em linfoma de Hodgkin clássico .....	61
Figura 9. Distribuição dos casos LHC CD20-positivo por subtipo histológico.....	62
Figura 10. Expressão de BSAP em LH clássico.....	63
Figura 11. Aspectos morfológicos e imunofenotípicos de LHPL.....	64
Figura 12. Expressão de Oct-2 e BOB-1 em LHPL.....	66
Figura 13. Esquema da metodologia aplicada.....	97
Figura 14. Organograma da metodologia e painel de anticorpos empregados no estudo com o resultado da imunoistoquímica.....	98
Quadro 1. Especificidade, concentração e fabricante dos anticorpos usados na imunohistoquímica.....	48
Tabela 1. Características dos casos: idade, sexo, diagnóstico por H&E, diagnóstico após a IHQ e resultados da imunoistoquímica.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Complexo Avidina-biotina-peroxidase
<b>ALK</b>	Quinase linfoma anaplásico
<b>ALK-1</b>	Quinase linfoma anaplásico/nucleofosmina
<b>Anti-IgG</b>	Anticorpo anti-imunoglobulina G
<b>BSAP</b>	Proteína ativadora específica de célula B
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>EBV</b>	Vírus Epstein-Barr
<b>EMA</b>	Antígeno de membrana epitelial
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>GMCSF</b>	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófago
<b>HMG</b>	Hospital Martagão Gesteira de Salvador
<b>HUPES</b>	Hospital Universitário Professor Edgar Santos
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-13</b>	Interleucina 13
<b>IL-2</b>	Interleucina 2
<b>IL-5</b>	Interleucina 5
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-7</b>	Interleucina 7
<b>IL-9</b>	Interleucina 9
<b>L&amp;H</b>	Célula variante linfocítica
<b>LACG</b>	Linfoma anaplásico de células grandes
<b>LAGC LH-símile</b>	LAGC Linfoma anaplásico de grandes células semelhantes a linfoma de Hodgkin
<b>LACG</b>	Linfoma anaplásico de células grandes
<b>LH</b>	Linfoma de Hodgkin
<b>LHC</b>	Linfoma de Hodgkin clássico
<b>LHCRL</b>	Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos
<b>LHEN</b>	Linfoma de Hodgkin esclerose nodular
<b>LHPL</b>	Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica
<b>LHPLN</b>	Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular

<b>LHCM</b>	Linfoma de Hodgkin celularidade mista
<b>LNH</b>	Linfomas não-Hodgkin
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>NK</b>	Célula matadora natural ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NPM</b>	Nucleofosmina
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Pax</b>	<i>Paired box</i> (“unido à caixa”)
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>REAL</b>	Revisão Européia e Americana de Linfomas ( <i>Revised European-American Lymphoma</i> )
<b>RNAm</b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>RS</b>	Reed-Sternberg
<b>StreptABC</b>	Estreptavidina-biotina-peroxidase
<b>TCR</b>	Complexo receptor para CD3
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator $\beta$ de transformação de crescimento
<b>TIA-1</b>	Antígeno Intracelular restrito a Células T-1
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TSAP</b>	Proteína ativadora específica de tecido
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia

## RESUMO

MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÉLULAS B NO DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DE HODGKIN . **JORGE RABELO DE SOUSA**. Estudos moleculares têm demonstrado que as células malignas dos linfomas de Hodgkin (LH) são derivadas de células B. Entretanto, apenas uma pequena parte das células neoplásicas destes linfomas expressa antígenos de diferenciação linfóide B. De acordo com o imunofenótipo, a Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou os LH em dois grupos: o LH clássico (CD30+, e CD20+/-), compreendendo 4 subtipos (celularidade mista, esclerose nodular, depleção linfocítica e rico em linfócitos) e o LH predominância linfocitária (LHPL) (CD30-, CD20+, BOB.1+ e Oct-2+). Assim, a imunofenotipagem tornou-se indispensável para classificar os LH e para realizar o diagnóstico diferencial do LH com outras entidades, como o linfoma anaplásico de grandes células (LACG), o qual exibe aspectos semelhantes à depleção linfocítica do LH. Estudar a utilidade de marcadores de célula B, no diagnóstico diferencial entre os subtipos do LH clássico e LHPL e LH e LACG. Foram estudados 109 casos consecutivos de LH em crianças até 16 anos, inclusive, diagnosticados entre 1973 e 2002 no Hospital Martagão Gesteira – Salvador/Ba. Os critérios de exclusão foram: insuficiência de material para imunohistoquímica e casos de recidiva. Foram utilizados os seguintes marcadores: CD20, BSAP, Oct-2, BOB.1, CD30, CD15 e ALK-1. Os casos de LH ocorreram predominantemente no sexo masculino (78%) com idade abaixo de 10 anos (67%). Dos 109 casos, 93 apresentaram o fenótipo clássico, 14 fenótipo LHPL, um LACG e um não classificado. Entre os LH clássicos, o subtipo mais comum foi celularidade mista (59,1%), seguido por esclerose nodular (35,5%), depleção linfocítica (4,3%) e rico em linfócitos (1,1%). A expressão de marcadores de célula B foi observada em apenas parte das células neoplásicas em 84 casos (90,3%) com fenótipo clássico, dos quais 18 foram positivos para CD20 e 66 para BSAP. Em contraste, nos casos de LHPL todas as células neoplásicas foram positivas para marcadores de célula B. Todas os casos de LHPL co-expressaram BOB.1 e Oct-2 nas células tumorais. Em nove casos CD30 positivos, as células tumorais foram negativas tanto para marcadores linfóides B quanto para a proteína ALK-1. Embora o imunofenótipo não tenha permitido o diagnóstico diferencial nestes casos, a morfologia era compatível com o LH. A imunohistoquímica é indispensável para o diagnóstico diferencial entre o LH clássico e o LHPL. Este método também contribui para o diagnóstico diferencial entre o LH e LACG, porém uns poucos casos permanecem na “zona cinza”, pois os anticorpos disponíveis não permitem o diagnóstico diferencial entre estas entidades. Em tais casos, a conjunção de morfologia, imuno-histoquímica e achados clínicos são indispensáveis para um diagnóstico conclusivo.

**Palavras chaves:** Linfoma de Hodgkin, Imunohistoquímica, Diagnóstico diferencial.

## ABSTRACT

MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÉLULAS B NO DIAGNÓSTICO DE LINFOMA DE HODGKIN . **JORGE RABELO DE SOUSA**. Molecular analysis has demonstrated that, in almost all cases of Hodgkin's Lymphoma (HL), the malignant cells derived from a clonal B cell. However, only some of the cases express surface B- cell antigen. According to the phenotype two groups of HL were recognized by the WHO: the classic (CD30+, CD20+/-, Oct-2+ or BOB.1+) comprising four subtypes and the lymphocyte predominance HL (LPHD) (CD30-, CD20+, Oct-2+, BOB.1+). LPHL has been recognized as a distinct entity occurring in adults with diverse clinic features. Immunophenotyping is important for the differential diagnosis between classic HL and LPHL and for differential diagnosis of HL versus anaplastic large cell lymphoma (ALCL) which may present similar morphology. To evaluate the use of B cell markers by immunohistochemistry in the differential diagnose of classic HL subtypes and LPHL and HL ALCL. 109 consecutive cases of HL in children, diagnosed between 1973 and 2002 in the Hospital Martagão Gesteira were studied. Exclusion criteria were: insufficient tissue for IHC, recidivated cases and age above 16. B-cell markers (CD20, BSAP, OCT-2, BOB.1), CD30, CD15 and ALK were used for immunohistochemistry. The HL cases occurred predominantly in males (78%) below 10 years old (67%). Of 109 cases, 93 were classic HL phenotype, 14 LPHL and one case was an ALCL. Among classic HL the most common subtype was mix cellularity (59,1%), followed by nodular sclerosis (35,5%), lymphocyte depletion (4,3%) and lymphocyte rich (1,1%). The expression of B-cell markers in tumor cells could be observed in 84 cases of classic phenotype (90,3%), of which 18 cases positive for CD20 and 66 for BSAP. In contrast to LPHD cases which all tumor cells were positive for B-cell markers, in classic HL this expression was seen in variable amount of tumor cells, but never in all cells. All LPHL cases co-expressed bob-1 and oct-2 in tumor cells. In seven CD30 positive cases, the tumors cells were negative for B-cells markers and for ALK-protein. Although the phenotype did not permitt the differential diagnosis with ALCL in these cases, the morphology was compatible with HL. Immunohistochemistry is indispensable to the differential diagnosis between classic HL and LPHL. It also contributes relevantly for the differential diagnosis between HL and ALCL, but a few cases remain in the called "gray zone", were the available antibodies do not allow for a distinction between these entities. In such cases the conjunction of morphology, immunohistochemistry and clinical findings should provide a conclusive diagnoses.

**Key words:** Hodgkin's lymphoma, Immunohistochemistry, Differential diagnose.

## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias linfóides abrangem um grupo diverso de entidades patológicas. Dentro do amplo grupo dos linfomas, o linfoma de Hodgkin (LH) é segregado de todas as outras formas, que constituem os linfomas não-Hodgkin. Do ponto de vista morfológico, o LH caracteriza-se pela presença de grandes células neoplásicas distintas, denominadas células de Reed Sternberg (RS), inseridas em um determinado meio celular. Células RS, entretanto, podem ser observadas em outras condições que não o LH, incluindo a monucleose infecciosa e os linfomas não-Hodgkin T e B. Assim, a simples identificação das células neoplásicas de RS é insuficiente para o diagnóstico do LH, sendo importante considerar a composição de cada tipo histológico.

Uma definição moderna do LH, portanto, requer incorporação de critérios imunológicos que diferenciem o LH de alguns subtipos de LNH, que são semelhantes histologicamente e freqüentemente indistinguíveis.

O estudo sistemático do imunofenótipo do LH levou à identificação de dois grandes grupos de linfomas de Hodgkin com fenótipos distintos, o LH com fenótipo clássico ( $CD30^+$ ,  $CD15^+$ ,  $CD20^-$ ) e o LHPL ( $CD30^-$ ,  $CD15^-$ ,  $CD20^+$ ). É importante a distinção do LH clássico, do LHPL, pois a última forma apresenta diferente curso clínico e imunofenótipo.

Na classificação de linfomas, adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2001, houve a inclusão de critérios imunoistoquímicos. A imunoistoquímica que já era usada para diagnóstico diferencial do LH com outros tipos de linfomas tornou-se indispensável para identificar casos de LHPL.

O presente trabalho foi concebido com objetivo de investigar a frequência do LHPL em crianças e também da frequência de sobreposição morfológica dos casos de LH e LACG. Utilizamos um painel mínimo de anticorpos, principalmente marcadores de linfócitos B, no sentido de fazer o diagnóstico diferencial entre LHPL e formas clássica de LH e LACG versus LH, em uma série de casos infantis diagnosticados previamente com LH. Pretendemos deste modo, contribuir com o estudo do LH no nosso meio.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 LINFOMA DE HODGKIN**

#### **2.1.1 Histórico**

Em 1832, uma doença rara acometendo linfonodos foi descrita por Thomas Hodgkin a qual recebeu o seu nome 30 anos mais tarde. As descrições iniciais da célula gigante do linfoma de Hodgkin (LH) ocorreram durante a segunda metade do século XIX, no entanto, é creditado a Sternberg e Reed o primeiro detalhamento e ilustrações desta célula e de outras características histopatológicas que definem o linfoma de Hodgkin (KAPLAN, 1981; RATHER, 1972).

Desde sua descrição inicial até recentemente, existiram muitas controvérsias quanto à natureza da doença de Hodgkin. No início, considerou-se esta doença como um processo inflamatório granulomatoso, semelhante à tuberculose. Por outro lado, alguns autores sugeriram tratar-se de doença crônica imunológica ou de neoplasia maligna (KAPLAN, 1980). Atualmente, a natureza neoplásica linfóide da doença de Hodgkin está bem estabelecida. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou o uso do termo linfoma de Hodgkin (LH) para substituir o de doença de Hodgkin (JAFFE et al., 2001).

Apesar do entendimento relativamente amplo dos muitos aspectos patológicos do LH, vários tópicos continuam sendo intensamente investigados. Estas investigações são de maior importância, porque o aprimoramento dos critérios diagnósticos, o entendimento da origem das células neoplásicas e o estudo das

características moleculares do LH podem contribuir para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos mais eficazes.

### **2.1.2 Conceito**

O LH é uma neoplasia hematopoética, cuja definição é baseada na identificação da célula de Reed Sternberg (RS) em um determinado meio celular. A célula neoplásica de RS é grande, podendo ser binucleada ou multinucleada, com nucléolo eosinofílico grande, semelhante a uma inclusão nuclear e citoplasma abundante e anfófilo (LUKES et al., 1966; LUKES, 1971). Existem variantes morfológicas destas células que ajudam no diagnóstico, incluindo a variante mononuclear, denominada célula de Hodgkin, a célula com núcleo em “pipoca” característica do tipo predominância linfocítica (célula linfo-histiocítica - L&H) e as células lacunares, predominantes no tipo esclerose nodular (LUKES, 1971).

Células semelhantes a RS e suas variantes são vistas em outras condições que não o LH, incluindo a monucleose infecciosa e os linfomas não-Hodgkin (LNH) (ANAGNOSTOPOULOS et al., 2000; STRUM et al., 1970; TINDLE et al., 1972). Assim, a simples identificação das células RS é insuficiente para o diagnóstico do LH, sendo importante considerar a composição de cada tipo histológico.

O meio celular no qual as células de RS estão imersas é frequentemente heterogêneo, particularmente nos tipos esclerose nodular e celularidade mista. Nestes tipos clássicos de LH, as populações celulares não neoplásicas incluem uma mistura de linfócitos pequenos, plasmócitos, células linfóides grandes, histiócitos, além de eosinófilos e neutrófilos, podendo ou não haver necrose.

A mistura de células inflamatórias e a variação do depósito colagênico encontrados no LH clássico têm sua provável explicação na expressão anormal de citocinas e quimiocinas pelas células de RS, incluindo as interleucinas: IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, e receptor IL-13, o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófago (GM-CSF), a linfotoxina- $\alpha$ , o fator de crescimento transformador (TGF  $\beta$ ), a eotoxina e a quimiocina *thymus and activation-regulated* (CC TARC) (HERB et al., 1996; JONES et al., 2000; KADIN et al., 1990; KADIN, LIEBOWITZ, 1999; KAPP et al., 1999; NANSEN, 1990; SKMNIDER et al., 2001; SAMOSZUK, NANSEN, 1990; TERUYA et al., 1999; VAN DEN et al.; 1999).

A definição do LH como um meio celular apropriado com células de RS é vago, por que o meio é variável e, como já foram referidas, células semelhantes a RS podem ser observadas em vários tipos de LNH (BENHARROCH et al., 1998; FANILI et al., 1998; FILLIPPA et al., 1996; 1992; MCBRIDE, 1996; PINKUS et al., 1997). Uma definição moderna do LH, portanto, requer incorporação de critérios imunológicos que diferenciem o LH dos subtipos de LNH, que são semelhantes histologicamente e freqüentemente indistinguíveis (CARBONE et al., 1995; FRIZZERA et al., 1999; KADIN, 1998; PINKUS et al., 1997; RÜDIGER et al.; 1998; SAIDJ, 1992).

### **2.1.3 Epidemiologia**

Nos Estados Unidos da América (EUA), o LH representa 14% dos linfomas malignos e 0,5% de todas as neoplasias malignas (KENNEDY et al., 1998). Os padrões epidemiológicos do LH diferem de acordo com o nível socioeconômico dos grupos estudados. Por exemplo, no terceiro mundo e nos centros médicos de

referência que atendem a populações de baixo nível socioeconômico nos EUA, há aumento na incidência em crianças (CORREA, O'CONNOR, 1971; HU et al., 1988).

Nos países desenvolvidos, o LH apresenta uma curva bimodal de ocorrência com um pico entre 20 e 29 anos, e o outro após os 50 anos. Nos países em desenvolvimento, o primeiro pico é antecipado para a faixa etária de 10-19 anos (FLAVELL et al., 2000; PÖTTER, 1999). Uma possível explicação para esse fenômeno é a exposição precoce a fatores ambientais, como o vírus Epstein-Barr (EBV) (FLAVELL et al., 2000). Maior frequência da infecção pelo EBV é observada nos LH pediátricos dos países em desenvolvimento quando se compara com os dos países industrializados (AMBINDER, GRIFFIN, 1991).

Estudos epidemiológicos têm implicado o EBV na grande maioria (80%-100%) dos casos de LH nos países da América do Sul enquanto nos EUA e outros países industrializados apresentam apenas 30-40% (RAZZOUK, 1997). Na Bahia, 86% dos LH pediátricos exibem infecção pelo EBV (ARAÚJO et al., 2000) Isto sugere que este vírus desempenhe papel importante na patogênese do LH pediátrico.

Alguns estudos têm sugerido que idade e o tipo histológico, e não a região geográfica, são os maiores determinantes da associação entre o EBV e LH. Em estudo comparativo de dois grupos pediátricos, cada um com 26 casos de LH, um do sul do Brasil e outro dos E.U.A., foi verificada positividade para o EBV de 58% em ambos os grupos. Isto indica, neste caso, que a associação do EBV com o LH é independente da localização geográfica; havendo, no entanto, uma maior frequência em crianças abaixo de 10 anos (RAZZOUK, 1997).

O risco de LH é significativamente aumentado em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (GOEDERT, et al., 1998). A incidência de LH é especialmente alta em populações com risco aumentado para infecção pelo vírus

da imunodeficiência humana (HIV) (MEDEIROS, GREINER, 1995). Nestes casos HIV positivos, a associação com o EBV é mais alta que na população imunocompetente.

#### **2.1.4 Classificação histopatológica**

Há mais de trinta anos, Lukes e Butler, (1966) estudando linfonodos propuseram uma classificação histopatológica para LH em seis subtipos, baseada nas características histológicas predominantes (LUKES, BUTLER, 1966). Eles usaram as características descritas inicialmente por Jackson e Parker (1947) de grupos histológicos que correspondiam a prognósticos distintos.

A classificação original de Lukes e Butler (1966) fundamenta a classificação de Rye, que tem sido amplamente usada desde 1966 (JAFFE et al., 1998; HARRIS et al., 1994, 1999; LUKES et al., 1966; STEIN, 1977). Esta classificação permitiu simplificação e padronização morfológica de grande aplicabilidade no diagnóstico e reconhecimento de grupos histológicos com distintos prognósticos como já foi referido. Ela considera quatro subtipos histológicos do LH: predominância linfocítica (PL), esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM) e depleção linfocítica (DL). Alguns autores recomendavam ainda a subdivisão do linfoma de Hodgkin esclerose nodular (LHEN) em subtipos: predominância linfocítica (LHEN-PL), celularidade mista (LHEN-CM), e depleção linfocítica (LHEN-DL), devido ao fato de apresentarem prognósticos diferentes (CARBONE et al., 1971; CIONINI et al., 1978).

A exemplo dos LNH, a incorporação dos conhecimentos imunoistoquímicos no LH resultou no reconhecimento de dois grupos de LH, o chamado LH clássico e o LH predominância linfocítica (LHPL). Estes tipos foram reconhecidos pela

classificação geral de linfomas, a REAL (*Revised European-American Lymphoma*), publicada em 1994. Assim, a REAL adotou os princípios morfológicos da classificação de Rye para os LH e adicionou os conhecimentos da imunofenotipagem, tornando-se mais precisa.

Em 2001, a OMS adotou a classificação REAL com modificações. Esta classificação enfatiza a estreita ligação entre os tipos histológicos do LH clássico, diferenciando-os do tipo LHPL que é essencialmente nodular (HARRIS et al., 1994; HARRIS, 1999; JAFFE et al., 1998; STEIN, 1977). Adicionalmente, *The British National Investigation* (MACLENNAN et al., 1989) recomendou a subclassificação do LHEN em graus I e II. Os casos com significativo pleomorfismo celular, numerosas células neoplásicas e depleção linfocítica são considerados como grau II e parecem estar associados a pior prognóstico (JAFFE et al., 1998; HARRIS, 1999; MACLENNAN et al., 1989; WIJLHUIZEN et al., 1989).

O linfoma de Hodgkin depleção linfocítica (LHDL) está incluído tanto na classificação REAL quanto na

proposta atual da OMS. Nesta última classificação, entretanto, o LHDL inclui casos que provisoriamente foram denominados na REAL de linfoma anaplásico de grandes células (LACG) semelhante a Hodgkin (HARRIS et al., 1994, HARRIS, 1999). Recentes estudos têm demonstrado que provavelmente quase todos estes casos estão biologicamente relacionados ao LH clássico (JAFFE et al., 1998). Estes casos, portanto, são considerados na classificação da OMS como LH clássico com aspecto semelhante ao LACG.

Embora as terapias modernas tenham reduzido as diferenças em relação ao prognóstico e sobrevivência, tradicionalmente encontradas entre os grupos histológicos do LH, a sua classificação patológica continua importante porque os

vários grupos histológicos correlacionam-se com parâmetros clínicos, incluindo estágio e localização da doença (BERNARD et al., 1971; BUTLER, 1971; DORFMAM, 1971). É importante a distinção do LH clássico do LHPL, já que esta última forma apresenta diferentes quadro clínico, morfologia e imunofenótipo (HARRIS et al., 1994).

## **2.1.5 Tipos histopatológicos dos linfomas de Hodgkin**

### **2.1.5.1 Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica (LHPL)**

O linfoma de Hodgkin predominância linfocítica (LHPL) compreende aproximadamente 5% dos casos de LH (COLBY et al., 1982). Ocorre, principalmente em homens, na quarta década de vida, com linfonodo persistentemente aumentado (AISENBERG, 1999; LUKES, BUTLER, 1966; ROSENBERG, CANELLOS, 1998). Apresenta-se usualmente em estágio clínico I ou IIA, com baixo fator de risco, com raro envolvimento do mediastino e com curso clínico relativamente indolente (AISENBERG, 1999; KAPLAN, 1980; ROSENBERG, CANELLOS, 1998). Uma minoria dos pacientes tem progresso da doença e alguns podem apresentar sítios extranodais (CHANG et al, 1995; SIEBERT, 1995). Linfomas de grandes células B podem ocorrer em pacientes com LHPL, mas, em geral, não são induzidos por terapia (MIETTINEN, 1983).

O LHPL possui características morfológicas, imunofenotípicas e moleculares únicas que diferem da forma clássica de LH (AISENBERG, 1999; MANSON et al., 1994; MARAFIOTI et al., 1997; POPPEMA, 1992; ROSENBERG, CANELLOS, 1998; SAIDJ, 1992). Uma delas é a proliferação da célula L&H, que representa a

população neoplásica do tumor (LUKES et al., 1966; LUKES, 1971). Estas células têm citoplasma pálido, núcleo lobulado ou multilobado, semelhante à pipoca (célula em pipoca), com cromatina frouxa e pequeno nucléolo (LUKES et al., 1966; POPPEMA, 1992). As células de fundo do LHPL constituem-se de pequenos linfócitos redondo reativos que podem estar isolados ou agrupados. Vêm-se macrófagos por vezes agrupados que lembram um granuloma epitelióide. Raramente observa-se eosinófilos, plasmócitos e necrose. O linfoma apresenta-se sob forma de nódulos poucos definidos e de tamanhos variados. As células de RS, incluindo a variante mononuclear, são raras e de difícil identificação, podendo não estar presentes (MANSON et al., 1994). Por isto, a identificação de células de RS não é obrigatória para o diagnóstico do LHPL (BUTTER, 1992; MANSON et al., 1994).

O LHPL possui imunofenótipo característico, distinto de todas os outros tipos de LH (HARRIS, 1999; MANSON , 1994; POPPEMA, 1992; SAIDJ, 1992). Os nódulos são constituídos por linfócitos B pequenos, ao lado de células L&H, que expressam antígenos restritos às linhagens de células B e que, ao contrário do LH, são negativas para CD30 e CD15 (RÜDIGER et al., 1998). As células neoplásicas freqüentemente expressam cadeia J da imunoglobulina e o antígeno de membrana epitelial (EMA) e podem expressar também antígeno comum de leucócitos (CD45). As células T reacionais freqüentemente expressam CD57 e podem ser observadas, formando rosetas em volta das células L&H. Este aspecto é importante para o diagnóstico diferencial com o LH clássico rico em linfócitos e com o linfoma de células B rico em células T (KAMEL et al., 1993).

## **2.1.5.2 Linfoma de Hodgkin clássico (LHC)**

### **2.1.5.2.1 *Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos (LHCRL)***

Linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos (LHCRL) é um novo tipo do LH que, originalmente, foi proposto como uma entidade provisória na classificação REAL e agora foi incorporado definitivamente na classificação da OMS (JAFÉ et al., 1977; HARRIS et al., 1994). As células de RS são relativamente infreqüentes e algumas células lacunares podem estar presentes e inseridas num fundo de linfócitos, com poucos eosinófilos e plasmócitos. Em contraste com o LHPL, as células neoplásicas têm morfologia de células de RS e expressam antígenos do LH clássico: CD30+, CD15+, podendo ou não expressar CD20 (HARRIS et al., 1994). Como exposto, o imunofenótipo é essencial para o diagnóstico de LHCRL e para sua distinção com o LHPL.

### **2.1.5.2.2 *Linfoma de Hodgkin esclerose nodular (LHEN)***

O linfoma de Hodgkin tipo esclerose nodular (LHEN) é o mais comum, em países industrializados, correspondendo a mais de 60% dos casos. Em relação a este tipo, há um bom nível de compreensão e consenso entre os patologistas (COLBY et al., 1982; HOLMAN et al., 1983; VON WASIELEWSKI et al., 1999). É o mais comum entre as mulheres e é o menos freqüente em pacientes com mais de 50 anos (BERARD et al., 1971; BUTLER, 1971). Causa envolvimento de linfonodos cervicais, supraclaviculares, do mediastino e de estruturas contíguas (BERARD et

al., 1971; LUKES et al., 1966). Na maioria dos pacientes, a doença apresenta-se em estágio II e tem excelente prognóstico.

Na Bahia-Brasil, Bittencourt et al., (1992), usando a classificação Rye, descreveram uma elevada frequência (56%) deste tipo na faixa pediátrica, incluindo como LHEN casos com nódulos completos e incompletos, de acordo com critério da literatura da época (KELLER et al., 1968; KADIN et al., 1971; PATCHEFESKY et al., 1973; CIONINI et al., 1978). Histologicamente, LHEN é caracterizado por faixa de tecido conjuntivo fibroso organizado e birrefringente, que isola grupos de células neoplásicas e inflamatórias formando nódulos. A proliferação celular linfóide é muito variável, sendo uma característica distinta a presença de células lacunares, variante da célula de RS (LUKES et al., 1966.) A identificação das células de RS clássicas pode ser prejudicada pela abundância das células lacunares (BUTTER, 1992). As células inflamatórias são predominantemente linfócitos, mas pode haver composição mista, de granulócitos e numerosos eosinófilos. Por vezes, observam-se abscessos eosinofílicos e áreas de necrose central (COLBY et al., 1982).

Há diferentes critérios para o diagnóstico anatomopatológico do LHEN. Segundo a classificação da OMS, 2001, para este diagnóstico é necessário o encontro de pelo menos um nódulo completamente envolvido ou fechado por fibrose (OMS, 2001). Outros autores incluem como LHEN casos com septos incompletos e mesmo sem septos, mas com aspecto lacunar (variante lacunar) (WARNKE et al., 1994).

Em estudos recentes, principalmente na Europa, ficou demonstrado que existe relação entre a composição histopatológica da esclerose nodular e a taxa de recidiva e sobrevida (FERRY et al., 1993; HAYBITTLE et al., 1985; MACLENNAN et al., 1989; WIJLHUIZEN et al., 1989). Assim, o LHEN foi classificado em graus I e II.

No grau I, são poucas as células de RS e não se observa depleção linfocítica. No grau II, pelo menos 25% dos nódulos devem exibir grupos de células malignas que preencham um campo de grande aumento (MACLENNAN et al., 1989). Embora esta classificação tenha sido recomendada pela OMS apenas para fins de pesquisa (STEIN et al., 2001), ela é importante para diagnóstico, porque o LHEN com extensas áreas de depleção linfocítica ou com riqueza de células pleomórficas lacunares têm resposta inicial péssima à terapia, ao lado de maior taxa de recidiva e menor taxa de sobrevida quando comparado com o subtipo I (FERRY et al., 1993; HAYBITTLE et al., 1985; MACLENNAN et al., 1989; WIJLHUIZEN et al., 1989).

#### **2.1.5.2.3 Linfoma de Hodgkin celularidade mista (LHCM)**

Depois da esclerose nodular, o linfoma de Hodgkin tipo celularidade mista (LHCM) é o tipo mais freqüente (COLBY et al., 1982; VON WASIELEWSKI et al., 1999). É um pouco mais comum em mulheres e está associado muitas vezes a sintomas sistêmicos. Em países subdesenvolvidos, inclusive na América Latina, este subtipo corresponde a virtualmente 100% dos casos pediátricos. No nosso meio, utilizando critérios da classificação de Ray, verificou-se que este subtipo ocorre com menor freqüência que o EN. (BITTENCOURT et al., 1992).

O LHCM apresenta-se em todos os estádios clínicos e tradicionalmente tem um prognóstico pior, semelhante à esclerose nodular (COLBY et al., 1982; KAPLAN, 1980; LUKES et al., 1966). Morfologicamente, o LHCM é caracterizado por uma população celular não neoplásica heterogênea, composta por um número variável de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos (MIETTINEN, 1983). Casos com áreas focais de necrose e/ou discreta fibrose focal não birrefringente podem ser

incluídos nesta categoria. As células de RS são detectadas com facilidade e exibem o mesmo fenótipo dos outros tipos do LH clássico (LUKES et al., 1966).

#### **2.1.5.2.4 Linfoma de Hodgkin depleção linfocítica (LHDL)**

O LHDL geralmente ocorre em pacientes idosos com sintomas constitucionais e em estágio II ou IV na época do diagnóstico (KAPLAN, 1978, 1980). É considerado como mais agressivo e com menor taxa de sobrevida (BUTLER, 1971; COPPLESON et al., 1973; KAPLAN, 1980; KELLER et al., 1968; LUKES et al., 1966). É visto mais frequentemente em países desenvolvidos e associa-se, com frequência, a infecções pelo HIV (STEIN et al., 2001).

Este tipo representa a forma menos comum do LH, encontrado em aproximadamente 1% dos casos (COLBY et al., 1982; VON WASIELEWSKI et al., 1999), e é a forma de mais difícil diagnóstico diferencial. Segundo alguns autores, este tipo deveria ser considerado como uma categoria do LACG (JAFFE et al., 1998; STEIN, 1977). Entretanto, casos considerados na classificação REAL como LACG semelhante à LH (*ALCL - anaplastic large cell lymphoma-Hodgkin-símile*) foram, à luz de estudos moleculares, reinterpretados como LH com morfologia e fenótipo semelhantes a LACG (BENHARROCH et al., 1998; HARRIS et al., 1994, 1999; JAFFE et al., 1998; KINNEY, KADIN, 1999). Estes casos representam uma forma agressiva do LH, que também têm alguma semelhança morfológica com casos de LHEN grau II.

Há duas subcategorias no LHDL, uma com a fibrose difusa e outro com fibrose reticular. Na difusa, há fibrose reticulínica desorganizada não birrefringente que tende a envolver célula individualmente, não sendo vistas faixas colagênicas.

Este subtipo de LH tem maior frequência de células de RS e depleção de células inflamatórias, particularmente de linfócitos. No entanto, poucas células inflamatórias podem ser observadas. O subtipo reticular é caracterizado por dois padrões básicos. O primeiro lembra o LHCM, tendo, no entanto, maior frequência de células de RS. No outro padrão, há também freqüentes células malignas, que são muitas pleomórficas, lembrando, por vezes, sarcoma (LUKES et al., 1966).

### **2. 1. 6 Alterações genéticas e moleculares em LH**

Seif e Spriggs (1967) foram os primeiros a demonstrar a evidência de clones de células malignas com aneuploidias no LH. Estudos subseqüentes de citogenéticas confirmaram que células gigantes de LH são aneuplóides e clonalmente relacionadas. Weber-matthiesen et al. (1995), utilizando simultaneamente imunofenotipagem por fluorescência e análise da citogenética na interfase, verificaram anormalidades numéricas de cromossomos em células de RS, CD30+ em todos tipos de LH. Eles encontraram uma alta variabilidade de números de cópias de certos cromossomos na metáfase em casos individuais diferentes e demonstram que esta instabilidade do cariótipo não era proveniente de artefato, mas particularmente uma característica *in vivo* de células de RS.

Anormalidades de cromossomos, recorrentes, não randômicas, têm sido identificadas em tecidos frescos e linhagens de células de LH. As anormalidades de cromossomos identificadas por Cabanillas et al. (1988), em tecidos frescos de pacientes com o LH, são muito consistentes com uma origem linfóide das células malignas do LH. As anormalidades mais comuns das foram encontradas em 11q23,

14q32, 6q11-12, e 8q22-24, sítios comuns de pontos de quebra em células B e T malignas.

Tilly et al. (1991) descobriram que algumas regiões cromossômicas alteradas em LH são também anormais em LNH com origem de células B (14q32, 8q24, 6q, e 11q21-q23) ou de células T (4q28, 7q31-q35, 3q27). O recorrente ponto de quebra 11q23 é o sítio do oncogene ETS o qual foi implicado na patogênese de um único tipo de leucemia linfoblástica aguda de célula B em crianças, caracterizada por expressão simultânea de antígenos mielóides e monocíticos (STRONG et al., 1985). As células de RS também expressam antígenos mielóides e monocíticos, por exemplo, CD15 (STEIN et al., 1982, HSU et al., 1984).

A translocação t(14;8)(q32;q21) que causa rearranjo no gene BCL-2 é característica do linfoma folicular (TSUJIMOTO et al., 1984; CLEARY et al., 1985), porém é rara em LH. Em estudos comparativos de citogenética e PCR para t(14;18), Poppema et al. (1992), detectaram freqüente envolvimento da região da cadeia pesada das imunoglobulinas na região 14q32, mas encontraram translocação envolvendo a região do BCL-2 no cromossomo 18q21 em somente um dos 28 casos estudados. As anormalidades 6q- estão presentes na região do oncogene MYB, que freqüentemente está envolvido nas neoplasias linfóides (OSHIMURA, SANDBERG, 1976; NOWELL et al., 1982). O ponto de quebra 8q24 está no locus do oncogene MYC (PELICCI et al., 1986). O gene do MYC coopera com BCL-2 para imortalizar células B (VAUX, 1988) e foi encontrado em célula B malignas com rearranjo do gene BCL-2 (GAUWERKY et al., 1988). Dados da literatura sugerem que os genes ETS, MYC-ETS, MYB, MYC, e menos freqüentemente BCL-2, são envolvidos na patogênese do LH e outras malignidades linfóides.

A fosfoproteína p53 é necessária na regulação do ciclo celular e induz apoptose em células com ácido desoxirribonucléico (DNA) danificado. Alterações genéticas do gene p53 são freqüentemente observadas em tumores humanos. Mutações de p53 gera uma proteína p53 estável com perda de seqüência-específica da atividade de ligação ao DNA e uma meia-vida longa anormal, conduzindo a sua hiper-expressão observada na imunohistoquímica. Mutações pontuais de p53 têm sido detectadas em culturas e em células de primárias de RS em todos os tipos histológicos, exceto no LHPL (GUPTA, et al. 1992; TRUMPER, et al., 1993). A identificação de mutações idênticas do gene p53 em múltiplas amostras de LH do mesmo paciente indica uma relação clonal entre as lesões distintas, e, além disso, que o LH representa uma neoplasia clonal (INGHIRAMI et al., 1994)

Além das alterações cromossômicas, a infecção pelo EBV pode constituir uma das várias etapas envolvidas na patogenia do LH. O papel do EBV na patogênese do LH foi suspeitado por Lukes e Tindle (1969) que chamaram a atenção para a semelhança morfológica entre as células de RS e imunoblastos. Estudos soroepidemiológicos têm demonstrado um risco aumentado de desenvolver LH em pacientes com história de monucleose infecciosa.

O EBV está implicado em um número variável de casos de LH. Em países em desenvolvimento, a freqüência desta infecção está relacionada principalmente aos subtipos celularidade mista e esclerose nodular (ELGUI et al., 2002). Esta infecção parece desempenhar um papel importante na gênese de LH em países em desenvolvimento, especialmente no grupo pediátrico.

Células de Reed Sternberg comumente expressam a LMP-1 (proteína latente de membrana), um produto de gene do EBV, (PALLESEN et al., 1991). Esta é uma *proteína transformadora que pode conferir uma vantagem de crescimento às células*

de RS (WANG et al., 1985). A transfecção do gene LMP-1 parece promover formação de células multinucleadas em linhagens L428, HBV-negativa, e este efeito é mediado por ativação de NF- $\kappa$ B (KNECHT et al., 1996).

LMP-1 pode ter efeitos adicionais em células de RS no desenvolvimento do LH. LMP-1 reprime a expressão de CD40, que previne apoptose em células de centro germinativo (BANCHEREAU et al., 1991; LIU et al., 1991). Curiosamente, centros germinativos de tonsilas, obtidas de crianças no Brasil, exibem infecção pelo EBV com freqüente expressão de LMP-1, porém em amostra de crianças da Alemanha, não há tal expressão (ARAÚJO et al., 1999). Este poderia ser um mecanismo para explicar o “salvamento” de células infectadas pelo EBV quando da sua passagem pelos centros germinativos. Estas células poderiam representar, em países em desenvolvimento, as precursoras dos LH EBV positivos.

Há controvérsia sobre a possibilidade da LMP-1 também induzir a expressão de BCL-2 em células de RS. O produto do gene BCL-2 protege células B do centro germinativo de apoptose. Henderson et al. (1991) mostraram que células B humanas são protegidas da apoptose por transfecção e expressão do LMP-1; este efeito resulta da repressão do BCL-2. Jiwa et al. (1993), entretanto, demonstraram que a expressão de BCL-2 e MYC em células do RS é independente de infecção do EBV e expressão de LMP-1. Khan et al. (1993) identificaram que a coexpressão LMP-1 e BCL-2 ocorria em unicamente 4% de pacientes com LH e o BCL-2 estava presente em um único subgrupo de células LMP-1+. A Infecção pelo EBV tem sido mais estreitamente associada com a expressão de BCL-X (SCHLAIFER et al., 1995). Igualmente, BAX, um gene que induz a morte celular, freqüentemente é expresso em células RS, mas usualmente em combinação com BCL-2 e BCL-X (BROUSSET

et al., 1196). É possível que freqüente expressão de BAX em células de RS possa explicar as boas respostas de pacientes do LH à terapia.

## 2.2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO LINFOMA DE HODGKIN

Células com morfologia semelhante a células de RS podem ser vistas em uma variedade de condições patológicas incluindo LHPL, linfomas T, linfomas B e mononucleose infecciosa (ANAGNOSTOPOULOS et al., 2000; STRUM et al., 1970; TINDLE et al., 1972). Os casos de LHPL e o subtipo de LH clássico, LHDL, são os que criam mais problemas para o diagnóstico e o estudo imunoistoquímico é de grande valor para o diagnóstico diferencial. Deste modo, pode-se diferenciar o LHPL do LHCRL, do linfoma folicular, da transformação progressiva de centros germinativos e ainda do linfoma B rico em células T.

O LHCRL possui perfil imunoistoquímico distinto do LHPL, devido à expressão no primeiro de CD30 e CD15. Os linfomas foliculares além de morfologia distinta, rica em centrócitos e centroblastos, não exibem rosetas de células T CD57-positivas em torno de células B blásticas, como se vê no LHPL. No linfoma B rico em células T, não se observam os nódulos de células linfóides B, como acontece no LHPL.

Segundo Anagnostopoulos et al., (2000), a imunoistoquímica é indispensável para diagnóstico de LHPL e também importante para confirmar o fenótipo dos tipos do LH clássico. Estes autores descrevem que mais de 50% dos casos classificados exclusivamente através de critérios morfológicos sofreram modificação do diagnóstico após a imunofenotipagem.

Dentre os LH clássicos, os tipos situados nos extremos quanto a freqüência de linfócitos, ou seja, o LHCRL e o LHDL, são os que mais se sobrepõem a outras

condições patológicas. Considerando o LHCRL, o diagnóstico diferencial mais importante é, como já comentado, com o LHPL. Já no LHPL, o diagnóstico diferencial inclui desde outros tipos do LH, como o LHEN grau II, até o LNH e outras neoplasias malignas indiferenciadas (CHITTA, DELSOL, 1997).

A imunoistoquímica ajuda pouco no diagnóstico diferencial entre os vários tipos histológicos do LH clássico, porém é de extrema valia no diagnóstico com outros linfomas e, principalmente, com outras neoplasias. Dentre os linfomas, os LACG são as mais difíceis para diferenciar do LHDL, porque há uma faixa de sobreposição dos mesmos quanto aos aspectos clínicos, morfológicos e imunológicos.

## 2.3 LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES

O LACG é caracterizado por freqüente proliferação de grandes blastos pleomórficos que exibem aspecto coesivo e constante expressão de moléculas CD30. Apesar do fenótipo semelhante ao LH, há heterogeneidade na citologia e no perfil antigênico das células tumorais, assim como nas características clínicas dos pacientes com LACG. Isto levou a distinção de várias morfologias, imunofenótipos e formas clínicas do LACG (CHAN et al., 1989; FALINI et al., 1997; KINNEY et al., 1993; MANN et al., 1995; PILERI, 1990). As sobreposições morfológicas e imunofenotípicas com o LH clássico foram também reconhecidas, levando, como já referido, a criação de uma condição patológica provisória na classificação REAL chamada LACG semelhante ao LH (CHITTAL, DELSOL, 1997; STEIN et al., 1985).

A análise dos marcadores das células T e B nos casos de LACG convencional revelou 3 imunofenótipos neste tumor, sendo o mais freqüente o tipo célula T (CHAN

et al., 1989; PENNY et al., 1991; STEIN et al., 1995). A cadeia  $\epsilon$  do complexo receptor para CD3 é um dos antígenos de células T expressos mais constantemente. Uma minoria de casos expressa CD4 e CD8, com um predomínio de CD4 (KRENACS et al., 1997; STEIN et al., 1995, 1992). A frequência do fenótipo tipo nulo depende do número de antígenos de células T investigados. A maioria, se não todos os casos com fenótipo nulo é constituída por células T. Isto se torna evidente quando um número grande de antígenos de células T, moléculas citotóxicas e a configuração de genes de receptores de célula T (TCR) são investigados. A vasta maioria dos LACG T/nulo abriga TCR  $\gamma$  e  $\beta$  rearranjados clonalmente e expressam moléculas citotóxicas, como perforinas, granzima B e antígeno intracelular restrito a células T-1 (TIA-1) (FELGAR et al., 1999; FOSS et al., 1996; KRENACS et al., 1997).

Considerando que moléculas citotóxicas são expressas não apenas por células T citotóxicas, mas também por células *natural killer* (NK) (GARCIA et al., 1990; SMYTH, APANI, 1995) e que as células NK ativadas podem expressar CD30 (CAMBIAGGI et al., 1993), há a possibilidade de que uma minoria do LACG T/nulo seja derivada de células NK, em vez de células T citotóxicas.

A descoberta da translocação entre o cromossomo 2 e 5 em 1989 e 1990 foi um marco para a determinação de um marcador molecular de LACG com imunofenótipo T/nulo (BITTER et al., 1990; KANEKO et al., 1989; MASON et al., 1990; RIMOKH et al., 1989). Em 1994, os genes participantes desta translocação que codificam as proteínas nucleofosmina (NPM) e a quinase do linfoma anaplásico (ALK), foram identificados (MORRIS et al., 1995).

O gene ALK não é expresso normalmente em nenhum tecido humano, à exceção de poucas células cerebrais (PULFORD et al., 1997) e em raros tumores de

tecidos moles (STEIN et al., 2000). Sua expressão está geralmente associada à fusão com outros genes, na maioria das vezes com NPM, causando desregulação no gene ALK. Anticorpos gerados contra a proteína ALK têm permitido estudos do padrão de expressão em um grande número de casos de LACG. A expressão deste gene está associada ao melhor prognóstico da doença (92,3%) e ocorre mais freqüentemente em crianças que em adultos (FALLINI, et al., 1999).

## 2.4 LINFOMA DE HODGKIN E LACG

Apesar das evidências de que o LACG e o LH são biologicamente distintos, os limites morfológicos e imunofenotípicos entre estes linfomas não são claros em certos casos (CHITTAL, DELSOL, 1997; STEIN et al., 1992, 1999; FRIZZERA, 1992). Isto se aplica especialmente aos casos de LH ricos em células tumorais e com depleção linfocítica (LHDL e LHEN grau II). No final da década 1980, investigadores, criaram uma categoria distinta, intermediária, sob o termo de LACG símile a LH. Estes casos, considerados limítrofes foram, então, agrupados nesta categoria (AGNARSSON, KADIN 1988; STEIN et al., 1992) e desta forma a classificação REAL incluiu-os como uma categoria provisória (HARRIS et al., 1994). Os tumores desta categoria mostram características morfológicas do LH e do LACG, contendo nódulos relativamente densos ou grupos de células tumorais com características das células de Hodgkin e das células de RS, com menor proporção de células inflamatórias reativas. A denominação de LACG-símile a LH reflete a tendência de acreditar que a maioria destes linfomas da zona limítrofe representa o LACG imitando o LH. Entretanto, a demonstração da expressão freqüente nestes tumores da proteína de ativação específica de células B (BSAP), na ausência da

proteína ALK, favoreceu a opinião de que a maioria dos casos representava uma variante do LH clássico rico em células neoplásicas e não um verdadeiro LACG, pois o padrão de expressão mencionado é característico do LH (FOSS et al., 1999). De acordo com isto, a nova classificação da OMS considerou estes casos como LH clássico (JAFFE et al. 1998; HARRIS et al., 1997; STEIN, 1997).

## 2.5 MARCADORES DO LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

As células de RS e suas variantes representam as células do LH clássico e comumente expressam antígenos CD30 (Ki-1/Ber-H2), CD15 (Leu M1), CD25 (Tac), CD71 (receptor de transferrina), e 1a (HLA-DR). O antígeno CD30 foi o primeiro reconhecido pelo anticorpo monoclonal contra Ki-1 em linhagem de células de LH (SCHWAB et al., 1982).

### 2.5.1 CD30

Em 1982, Stein e colaboradores (SCHWAB et al., 1982; STEIN et al., 1982) descobriram uma nova molécula que foi inicialmente denominada Ki-1 e, subseqüentemente, reconhecida como CD30 (FALINI et al., 1995; SCHWARTING et al., 1989). Esta molécula é fortemente expressa nas células neoplásicas do LH e em células do LACG, enquanto é fracamente ou focalmente expressa no linfoma B mediastinal, em alguns linfomas T e ainda no carcinoma embrionário. Está ausente nas células de todos os tecidos normais, exceto em blastos linfóides ativados e dispersos, preferencialmente, localizados na zona interfolicular (STEIN et al., 1985). Estudos bioquímicos e de clonagem molecular revelaram que o CD30 é um receptor

transmembrana de citocina com 120-kD, da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) para o qual o ligante CD30L foi identificado. Uma forma solúvel de 85-kD do CD30 foi descoberta sendo liberada de moléculas ligadas à membrana por clivagem proteolítica (HANSEN et al., 1995) podendo ser detectada no soro dos pacientes com CD30 reativo e lesões neoplásicas (NADALI et al., 1995; ZINZANI et al., 1998).

A expressão do antígeno CD30, juntamente com o receptor da IL-2 pode ser induzida em células linfóides normais B ou célula T por exposição à fito-hemaglutinina, vírus da leucemia humana de células T (*human T-cell leukemia viruses*), EBV, ou *Staphylococcus aureus* (STEIN, et al., 1985). O anticorpo Ki-1 reage com as células de RS e com a população de células linfóides não malignas, localizada entre, em volta, e de vez em quando dentro dos folículos de células B (SCHWAB et al., 1982; STEIN, et al., 1985). O antígeno CD30 pode ser também detectado em monócitos ativados *in vitro* (ANDREESEN et al., 1989; PFREUNDSCHUH et al., 1988).

A detecção do antígeno CD30 pôde ser feita em tecido incluído em parafina, a partir do desenvolvimento do anticorpo Ber-H2, o qual detecta um epítipo formalina-resistente do antígeno CD30 (SCHWARTING et al., 1989). No entanto, a expressão do CD30 não é restrita às neoplasias linfóides. Palleson et al., (1988) descobriram a expressão de CD30 na maioria dos carcinomas embrionários e em alguns tumores mistos de células germinativas. Schwarting et al., (1989), expandiram a lista das neoplasias que expressam o CD30, incluindo o carcinoma pancreático e, raramente, carcinomas de tórax, pulmão, bexiga, endométrio e melanomas, com positividade fraca e difusa no citoplasma das células tumorais.

## 2.5.2 CD15

O antígeno Lewis X (Leu M1/CD15) é um carboidrato encontrado em numerosas proteínas envolvidas nos eventos de adesão celular, durante os estágios iniciais de extravasamento de leucócitos. Reconhece as selectinas E e P expressas no endotélio ativado, em leucócitos e células tumorais (SCHUZE-FOSTER, 1997)

Leu M1/CD15 é um antígeno bem caracterizado da superfície de células hematopoéticas. O anticorpo para deste antígeno marca também o citoplasma de granulócitos e a membrana de células dendríticas reticulares, após digestão com neuroaminidase. O CD15 é encontrado em carcinoma pulmonar de células pequenas e em células do adenocarcinoma gástrico. É expresso também em células de RS derivadas do LH clássico freqüentemente em linfoma T e célula mielóide. Este marcador celular contribui para diferenciação entre LH e outras doenças linfoproliferativas (TAKEI et al., 1989).

## 2.6 ORIGEM DA CÉLULA NEOPLÁSICA DO LINFOMA DE HODGKIN

A origem das células de RS tem sido tema de pesquisas desde a década de 70. Inicialmente, postulava-se sua origem em histiócitos e até se acreditava que fosse uma célula híbrida. Apenas após o isolamento de células de RS através de micromanipulação e subsequente análise do rearranjo das imunoglobulinas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) é que foi possível demonstrar que estas células derivam-se predominantemente, em 98% dos casos, de linfócitos B (KANZLER et al., 1996; KUPPERS et al., 1994; MARAFIOTI et al., 2000). Entretanto, uma minoria exibe rearranjo de TCR, demonstrando sua origem em linfócitos T

periféricos. Um grande paradoxo desta célula é que o seu fenótipo não corresponde necessariamente ao seu genótipo (MARAFIOTI et al., 2000, STEIN et al., 2001). Apesar da origem em células B, uma grande proporção de LH, com exceção do LHPL, não expressa regularmente marcadores de diferenciação B como outros linfomas B. Por outro lado, cerca de 20% de casos de LH expressam moléculas citotóxicas, propriedade em células T (OUDEJANS et al., 1996). Já que esta proporção é muito maior que o número de LH comprovadamente originados de células T (cerca de 2 %), acredita-se que as células de RS devem expressar genes anômalos, não compatíveis com a sua diferenciação.

## 2.7 ORIGEM DA CÉLULA DE RS EM LINFÓCITOS B

Estudos moleculares demonstraram que a célula neoplásica do LH possui rearranjo monoclonal dos genes de imunoglobulinas (Ig). Estes genes rearranjados contêm grande proporção de mutações somáticas na porção variável da cadeia pesada de Ig. Como que estas mutações ocorrem virtualmente apenas em células B, durante a sua passagem pelo centro germinativo, acredita-se que as células de RS originam-se dos centros germinativos (MARAFIOTI et al., 2001) O estudo de linfomas compostos, LH e linfoma folicular demonstram que estes têm um precursor comum, sendo mais um indício para a origem deste linfoma em células do centro germinativo e não após a saída do centro germinativo, como postulado por alguns autores.

## 2.8 MARCADORES DE CÉLULAS B DE SUPERFÍCIE EM LH

### 2.8.1 Imunoglobulinas

A maioria dos marcadores de superfície de células B está ausente nas células de RS incluindo a expressão de Ig. Estudos preliminares levaram a conclusão que estas células eram incapazes de produzir Ig, devido à aquisição de mutações inversas levando códons de terminação ou interferindo com a ligação antigênica. Estudos através de hibridação *in situ* demonstraram que as células não possuem ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de Ig mesmo na ausência de mutações do gene da Ig (STEIN et al., 2001). Outros estudos têm demonstrado que a ausência de transcrição do RNA da Ig é provocada pela inativação do promotor que parece ser consequência da falta do fator de transcrição Oct2 ou do seu co-ativador BOB.1 (CHANG et al., 1999; SHAH et al., 1997).

### 2.8.2 CD20 e CD79a

Apesar de recentes evidências da origem do LH clássico a partir de células do centro germinativo, a molécula clássica para de marcação de células B, a CD20, está presente apenas em uma parte de casos de LH. Alguns autores referem sua presença em 20% dos casos e outros em até 40% (TZANKOV et al., 2003). Entretanto esta expressão é de intensidade variável e limitada a uma minoria das células.

O CD79a é expresso quase que exclusivamente em células B e em neoplasias de células B. Sua expressão precede o rearranjo do gene da cadeia

pesada da Ig, expresso durante a ontogenia da célula B e cronologicamente desaparece depois do CD20, quando a célula se diferencia em plasmócitos. A positividade para CD79a no LH é ainda menor quando comparada com a do CD20 (CHU, ARBER, 2001).

## 2.9 FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR

### 2.9.1 Oct-2, BOB.1

Apesar das células L&H, características de LHPL, e as células neoplásicas de LHC conterem rearranjo de Ig, há diferenças na expressão de moléculas associadas a células B (CD20, CD79a, cadeia J e transcritos de Ig) entre os dois grupos celulares. Esta diferença está, a princípio, relacionada com mutações no gene de Ig, nas células neoplásicas do LHC e sua integridade nas L&H, (KANZLER et al., 1996; KÜPPERS et al., 1999). Outros estudos, no entanto, apontam para um defeito no mecanismo de transcrição, pois os genes de Ig das células de RS e suas variantes encontram-se intactos em muitos casos de LHC (MARAFIOTI et al., 2000).

Os fatores transcricionais Oct-1 e Oct-2 e seus coativadores BOB.1/OBF.1 regulam a transcrição do gene da Ig (CHANG et al., 1999; SHAH et al., 1997). Oct2 e seu coativador BOB.1 são regularmente expressos em células L&H e estão ausentes ou com defeito nas células neoplásicas de LH. Estas moléculas constituem marcadores para distinguir entre casos de LHPL e LHC. Além disso, a superexpressão de Oct-2 em células L&H possibilita a distinção entre estas células e as células de RS e suas variantes (STEIN et al., 2001).

## 2.9.2 BSAP

A proteína ativadora específica da linhagem de célula B (BSAP) é um outro fator de transcrição de 52-kD, originalmente identificado como um homólogo da proteína ativadora específica de tecido (TSAP) da estrela-do-mar (BARBERIS et al., 1990).

A BSAP é codificada pelo gene *paired box* (PAX-5), um membro altamente conservado da família de genes de fatores de transcrição (ADAMS et al., 1992) e é equivalente ao NF-HB,  $\alpha$ -BP, NF $\mu$ -B1, LR1, e EBB, fatores de transcrição específicos de células B identificados por outros investigadores (SINGH et al., 1993; WATERS et al., 1989; XU et al., 1992).

Entre células hematopoéticas, a expressão do gene PAX-5 é restrita à linhagem de células B (BARBERIS et al., 1990). A transcrição do gene PAX-5 é iniciada em células pró-B e é abundante em células pré-B e células B maduras, mas ausentes no fim de diferenciação de células plasmáticas (BARBERIS et al., 1990; ADAMS et al., 1992). A expressão do gene PAX-5 também ocorre no mesencéfalo e cordão espinhal durante embriogênese e em testículo de adultos (ADAMS et al., 1992).

A BSAP tem sido implicada na regulação de vários genes específicos de células B, no controle do desenvolvimento de células B e a na mediação do balanço entre a proliferação de células B e secreção de Ig (BUSSLINGER, URBÁNEK, 1995; MAX et. al., 1995). O significado funcional de sítios de ligação da BSAP dentro de promotores de CD20 tem sido investigado (KEHRL, et al. 1994). Os sítios de ligação do BSAP são encontrados a montante de regiões de troca de classe de Ig,

sugerindo que a BSAP tem um papel importante neste fenômeno (WATERS et al., 1989; XU et al., 1992; WAKATSUKI et al., 1994).

Recentemente, a BSAP tem sido considerada como reguladora do desenvolvimento de células B-maduras (WAKATSUKI et al., 1994; MAX et al. 1995). A desregulação deste gene parece contribuir para tumorigênese de malignidade linfóide (KRENACS et al., 1998).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

Investigar o fenótipo, em 109 casos de LH pediátricos, por meio de estudo imunoistoquímico.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Identificar casos de LH clássico;
- Estudar a expressão de marcadores de células B em células neoplásicas do LH clássico;
- Identificar os casos de LHPL dentre os casos diagnosticados como LH;
- Fazer o diagnóstico diferencial entre LH clássico e LAGC pela detecção de ALK-1 e de marcadores de diferenciação de células B;
- Correlacionar os diferentes subtipos de LH com alguns aspectos epidemiológicos;
- Avaliar as dificuldades de diagnóstico diferencial, mesmo com estudo imunoistoquímico, entre o LH clássico e o LHPL e o LAGC.

## 4 JUSTIFICATIVA

Estudos moleculares recentes têm demonstrado que as células malignas do LH exibem, na sua grande maioria, rearranjo de imunoglobulinas e são, portanto, derivados de células B. Apenas um pequeno percentual destes linfomas, no entanto, expressa antígenos típicos de superfície de diferenciação de células B, incluindo imunoglobulinas.

O estudo sistemático do imunofenótipo do LH levou à identificação de dois grandes subgrupos de linfomas de Hodgkin com fenótipos distintos, o LH clássico (CD30+, CD15+ e CD20 +/-) e o LHPL (CD30-, CD15-, CD20+). LHPL foi descrito como uma entidade acometendo adultos com média de 45 anos de idade. Esta nova classificação, incluindo critérios imunoistoquímicos, foi adotada pela OMS em 2001. A imunoistoquímica, que já era usada para diagnóstico diferencial do LH com outros tipos de linfomas, tornou-se indispensável para identificar casos de LHPL.

Adicionalmente, a imunoistoquímica é útil no diagnóstico diferencial do LH com o LAGC, um linfoma com aspectos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos sobrepostos ao LH; contudo, ao contrário do LH, apresenta imunofenótipo diferente com células que expressam marcadores T ou são nulas, ou seja, negativas para T e B.

Recentemente, foi descrito um novo marcador de células B, um anticorpo que reconhece a proteína BSAP codificada pelo gene PAX-5, responsável pela ativação da transcrição dos antígenos de diferenciação celular B e que está presente em 90% dos casos de LH. Este anticorpo constitui uma grande contribuição para o diagnóstico diferencial entre LH e LAGC.

Como pouco se sabe acerca da frequência do LHPL em crianças e também da frequência de sobreposição morfológica dos casos de LH e LACG nesta faixa etária, resolvemos utilizar um painel mínimo de anticorpos, no sentido de fazer o diagnóstico diferencial entre LHPL e formas clássicas de LH e LACG versus LH em uma série de casos infantis diagnosticado como LH.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo foi executado no Laboratório de Anatomia Patológica e de Imunoistoquímica do Hospital Universitário Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia (HUPES/UFBA), onde foram realizados a revisão de casos e o estudo imunoistoquímico. Os casos foram levantados a partir dos laudos anatomo-patológicos de LH do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Martagão Gesteira da Liga Bahiana Contra a Mortalidade Infantil. Os blocos referentes a estes casos foram obtidos do arquivo deste Serviço.

### 5.2 MATERIAL

Foi realizado um levantamento retrospectivo de casos ocorridos entre janeiro de 1973 a junho 2002 com diagnóstico anatomopatológico de LH. Em todos os casos, foram coletadas informações sobre idade, sexo, sítio da biópsia e diagnóstico inicial, através de revisão dos laudos e prontuários. Os critérios adotados para inclusão foram: 1) idade até 16 (inclusive); 2) presença de material suficiente para recorte para imunohistoquímica; 3) corresponder ao sítio primário e ser material de linfonodo; 4) não constituir material de recidivas. As lâminas iniciais foram revisadas histologicamente, por dois patologistas independentes, para confirmação dos tipos do LH e do grau histológico do LHEN. Foi utilizada a classificação de linfomas da OMS de 2001, sendo considerados como casos de LHEN somente aqueles que tinham pelo menos um nódulo completamente envolvido por fibrose.

Foram levantados 181 casos com diagnóstico de LH, dos quais 72 casos foram excluídos porque não atenderam aos critérios acima referidos. O protocolo utilizado no estudo está representado na figura 1.

### 5.2.1 Anticorpo

O painel de anticorpos monoclonais utilizados está referido na tabela 1.

**QUADRO 1: Especificidade, concentração e fabricante dos anticorpos usados na imunoistoquímica.**

Anticorpo	Clone	Especificidade	Diluição	Fabricante
CD30	BerH2	Linfócitos reativos, células de RS e variantes e célula de LACG	1:5	DAKO
CD15	C3D1	Granulócitos, células de RS e variantes	1:25	DAKO
CD20	L26	Linfócitos B	1:50	DAKO
BSAP	24	Linfócitos B	1:50 e 1:25	BD Biosciences
Oct-2	Policlonal	Linfócitos B	1:200	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
BOB.1	Policlonal	Linfócitos B	1:200	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY
ALK-1	5A4	Células neoplásicas de linfoma de grandes células T e nula	1:20	NOVOCASTRA

## 5.3 MÉTODO

### 5.3.1 Estudo imunoistoquímico

#### 5.3.1.1 Preparo de lâminas

Antes de receber os cortes de tecido, as lâminas foram mergulhadas em solução sulfocrômica por 24 horas (Dicromato de Potássio 50 g + 50 mL de ácido

sulfúrico para 500 mL de água corrente). Ao final deste período, foram lavadas em água corrente e permaneceram em álcool absoluto até serem utilizadas.

No momento do uso, as lâminas foram imersas rapidamente em cola Cascolar (acetato de polivinila) diluída em água na proporção de 1:4, conforme descrito em Barbosa (1997) e secções de 4 µm, cortadas em micrótomo e colocadas sobre estas lâminas. Para garantir a adesão dos cortes, as lâminas permaneceram em estufa a 60°C por cerca de 24-48 horas antes da aplicação da técnica.

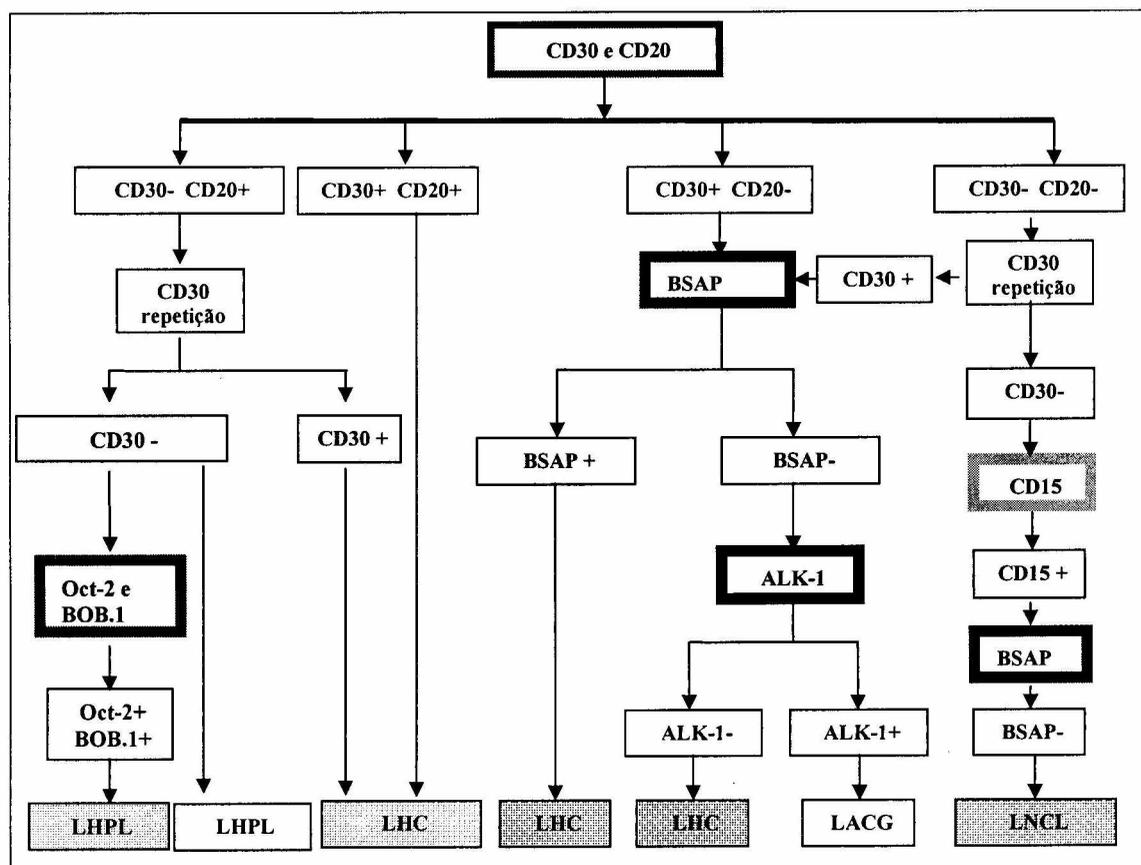


Figura 1 - Organograma da metodologia e painel de anticorpos empregados no estudo.

### 5.3.1.2 Técnica

As secções foram desparafinizadas em xilol (2 banhos de 5' cada), lavadas em álcool absoluto (1 banho de 3') e depois em álcool a 70% (1 banho de 3') e

reidratadas em água corrente. A recuperação antigênica, realizada com o objetivo de melhorar a reatividade dos tecidos, foi feita por incubação em calor úmido com as lâminas colocadas em cubeta apropriada e então imersas em 1000 mL de tampão citrato, 0,1 M, pH 6.0, em panela de pressão (WMF *Perfect*, Germany), durante 2 minutos, contados a partir da fervura. Após resfriamento, seguiu-se lavagem em água corrente, passando-as para um recipiente com salina tamponada com fosfato (PBS) (diluição de 1:10).

Após ter sido retirado das lâminas o excesso de PBS e demarcado o corte de tecido com caneta apropriada, *Pap Pen* (DAKO, US), estas lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em PBS, conforme diluições previamente padronizadas (Quadro 1), por 35 minutos a 37°C, em câmara úmida. Foi utilizado o volume de 100 µl/lâmina para todos os anticorpos, com exceção do anticorpo anti-CD30, para o qual usamos volume de 200 µl/lâmina. Foram utilizadas duas técnicas para revelação: o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC)/Estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC) e o Sistema Envision (DAKO, US).

No método StreptABC, empregado nos anticorpos CD20 e ALK-1, após incubação dos anticorpos primários e posterior lavagens com PBS (duas vezes), as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário, Ig de coelho anti-IgG de camundongo biotilado, na diluição 1:300 (DAKO,US), por 30' a 37°C. Após lavagens com PBS (duas vezes), as lâminas foram incubadas com streptoavidina peroxidase na diluição 1:50 (DAKO,US), por 30' a 37°C (HUS et al, 1981). As secções foram lavadas por duas vezes em PBS, sendo aplicado o cromógeno DAB (Diaminobenzidina), usado na diluição de 10 µl de DAB/1 mL de tampão, conforme orientação do fabricante. Foi utilizado 100 µl/lâmina de DAB e incubado por

aproximadamente 5 minutos à temperatura ambiente até se obter coloração. (Método esquematizado no anexo 1).

A técnica da imunistoquímica, pelo método indireto empregando o *Envision System* (DAKO), utilizada nos anticorpos BSAP, Oct-2, BOB.1, CD30 e CD15 foi realizada da seguinte maneira: após incubação dos anticorpos primários e posterior lavagens com PBS (duas vezes), realizou-se a incubação das secções com o anticorpo secundário (polímero marcado com peroxidase – Kit ENVISION) – 100µl/lâmina – por 30 minutos a 37° C e subsequente incubação com o cromógeno DAB (diluição: 1 gota/mL do tampão – Kit ENVISION) – 100 µl/lâmina, à temperatura ambiente por cerca de 5'. Realizaram-se duas lavagens com PBS entre as incubações. Quando se notava coloração acastanhada nas lâminas, após a etapa de incubação com o DAB, as mesmas foram devolvidas para a cuba com PBS. (Método esquematizado no anexo I)

Para a análise microscópica das lâminas é necessário contra-corá-las. Deste modo, são dispostas numa galeria, mergulhadas em hematoxilina de Harris por 2', lavadas em água corrente, desidratadas em álcool absoluto limpo (dois banhos), seguidas de dois banhos de xilol limpo. As lâminas são posteriormente montadas com bálsamo do Canadá e lamínula.

### **5.3.1.3 Interpretação das reações de imunistoquímica**

Os procedimentos da técnica de imunistoquímicas foram realizados em séries de 10 lâminas (CD15, ALK-1, Oct-2 e BOB-1) a 20 lâminas (CD20 e CD30), juntamente com controle positivo previamente testado. Após cada bateria de lâminas, elas eram analisadas, sob microscopia óptica, com o objetivo de verificar a

positividade e padrão da reatividade do anticorpo. Nos casos que apresentaram fraca reatividade, as reações foram repetidas na série subsequente. Foi feito controle negativo com a omissão do anticorpo primário para todos os marcadores.

O patologista não teve conhecimento prévio do diagnóstico inicial quando julgou a positividade dos marcadores empregados. Depois de finalizados os estudos imunoistoquímicos, os resultados foram devidamente transcritos na tabela e os casos foram analisados conjuntamente, utilizando as lâminas de HE e de imunoistoquímica.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Dos 109 casos estudados, 85 (77,98%) eram do sexo masculino e 24 (22,02%) do sexo feminino. A idade variou de 3 a 16 anos, com a idade média de oito anos e sete meses. A distribuição geral dos casos por sexo e idade pode ser observada nas Figuras 2 e 3.

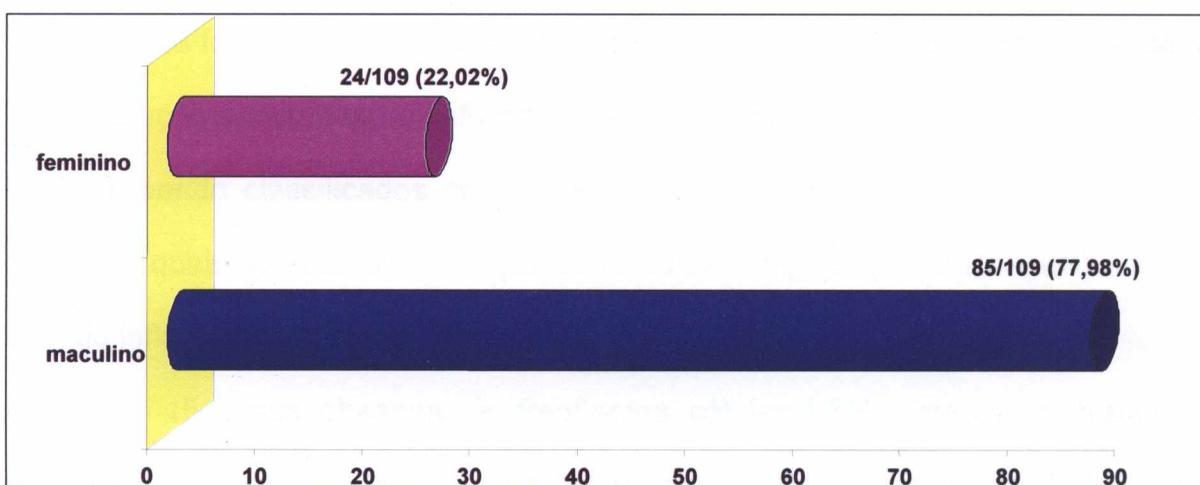


Figura 2. Distribuição do total de casos estudados por sexo.

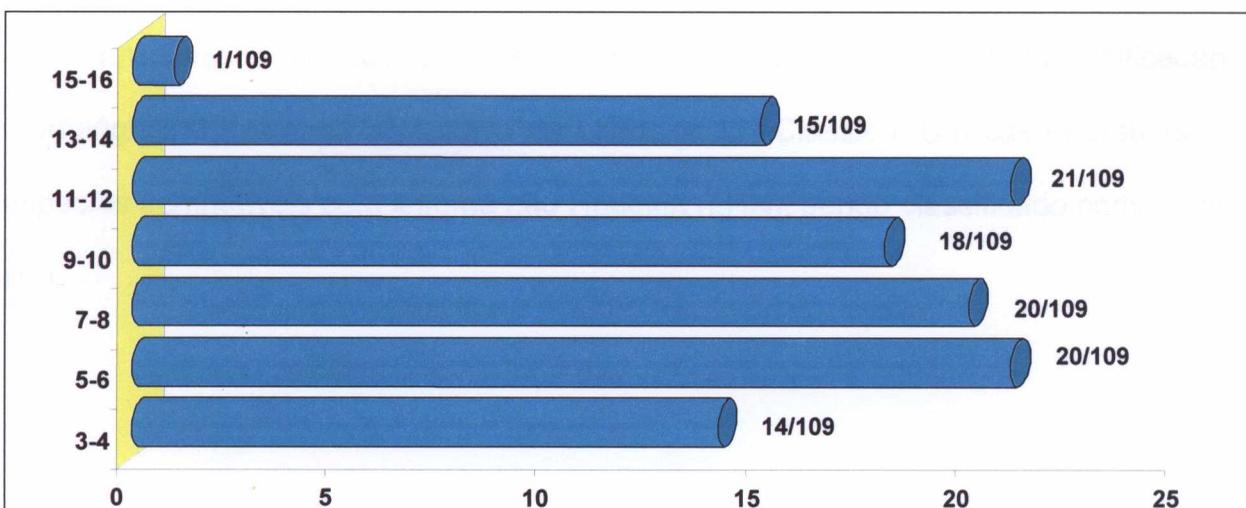


Figura 3. Distribuição do total de casos estudados por faixa etária.

## 6.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

Um total de 88 casos foi considerado LH clássico segundo os critérios morfológicos da OMS, 2001. Destes casos, 19 casos exibiam septos fibrosos delimitando pelo menos um nódulo completo, sendo classificados como LHEN. Alguns casos, no entanto, inicialmente classificados como LHCM, apresentavam fibrose capsular densa com pouco material no recorte. Isto nos levou à revisão das lâminas originais arquivadas, verificando-se a presença de nódulo completo em 16 casos. Desta forma, perfazendo um total de 35 casos do subtipo LHEN. Em 4 casos havia redução acentuada de linfócitos com células malignas prototípicas, disposição sincicial, sendo classificados como LHDL. O subtipo LHCM foi observado em 49 casos, os quais apresentavam freqüentes células malignas (RS e Hodgkin) em meio a fundo inflamatório misto.

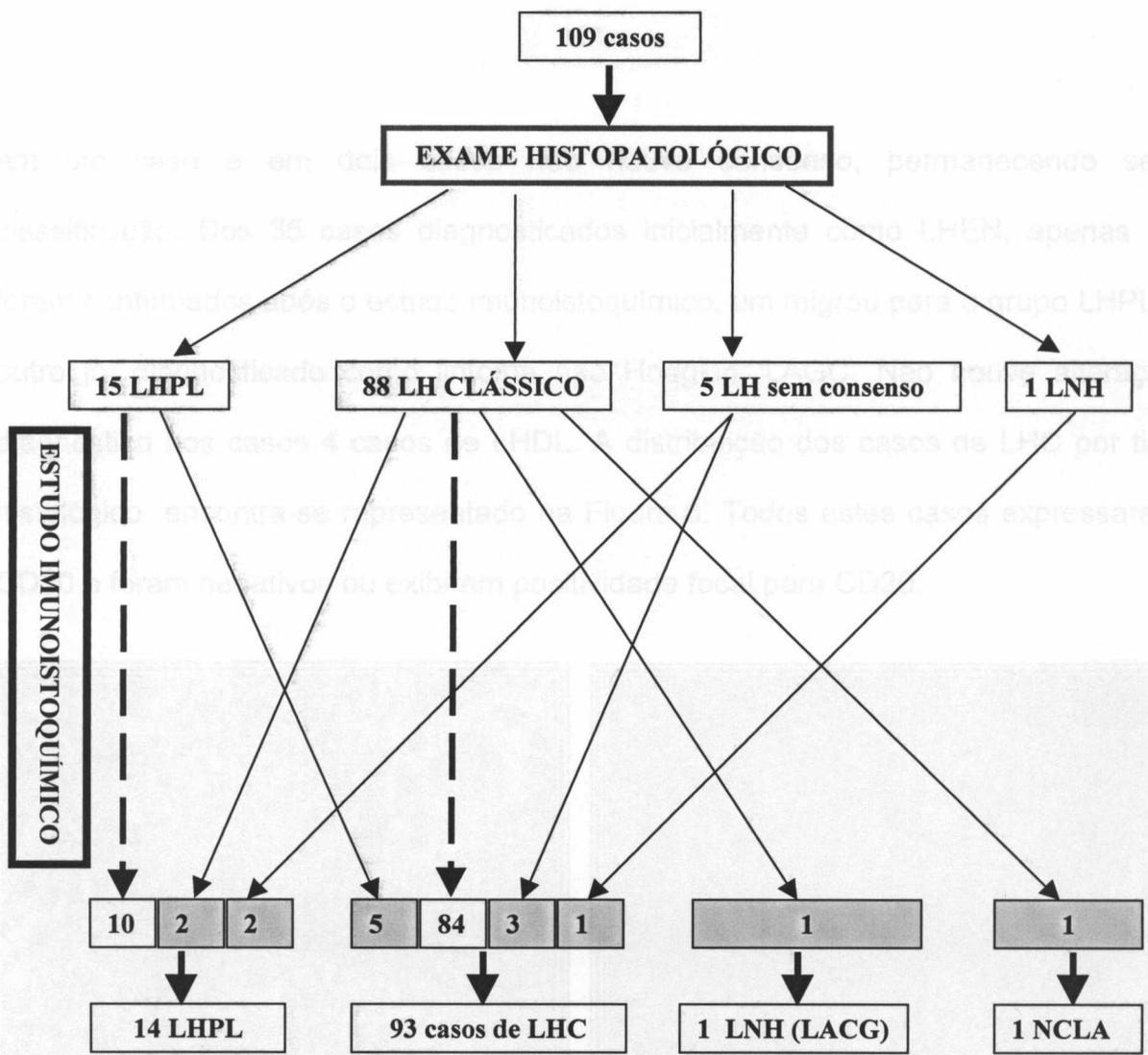
Em 15 casos observou-se freqüentes células L&H, riqueza de histiócitos, ausência ou raros eosinófilos e/ou plasmócitos e esboço de nódulos. Estes casos foram classificados como LHPL. Não foi possível a distinção morfológica clara entre este subtipo e LH clássico rico em linfócitos.

Em 5 casos não houve consenso entre os patologistas quanto à classificação morfológica, ou seja, se se tratava de LHPL ou LH Clássico. Um caso apresentou aspectos compatíveis com linfoma não Hodgkin (LHN), sendo classificado como este tipo.

### 6.3 ASPECTOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Utilizando o painel de anticorpos CD30, CD20, BSAP e ALK-1, identificamos 93 casos de LH Clássico, 14 LHPL, 1 linfoma não Hodgkin (LAGC) e em um caso não foi possível classificação. Dos 93 LH Clássico, apenas 84 haviam sido diagnosticados morfolologicamente. Os nove casos restantes exibiram os seguintes diagnósticos morfológicos prévios: cinco LHPL, três não houve concordância quanto à classificação e um caso de linfoma não Hodgkin.

Dos 14 casos de LHPL apenas 10 foram reconhecidos morfolologicamente, os 4 restantes haviam sido interpretados como LHEN (1 caso), LHCM (1 caso) e em dois diagnósticos não houve consenso para a classificação morfológica. O único caso de LAGC havia sido diagnosticado previamente como LHEN. Um caso classificado morfolologicamente como LHC, permaneceu sem classificação após a IHQ. Em 15, dos 109 casos, houve alteração do diagnóstico morfológico inicial após o estudo imunohistoquímico (Figura 4).



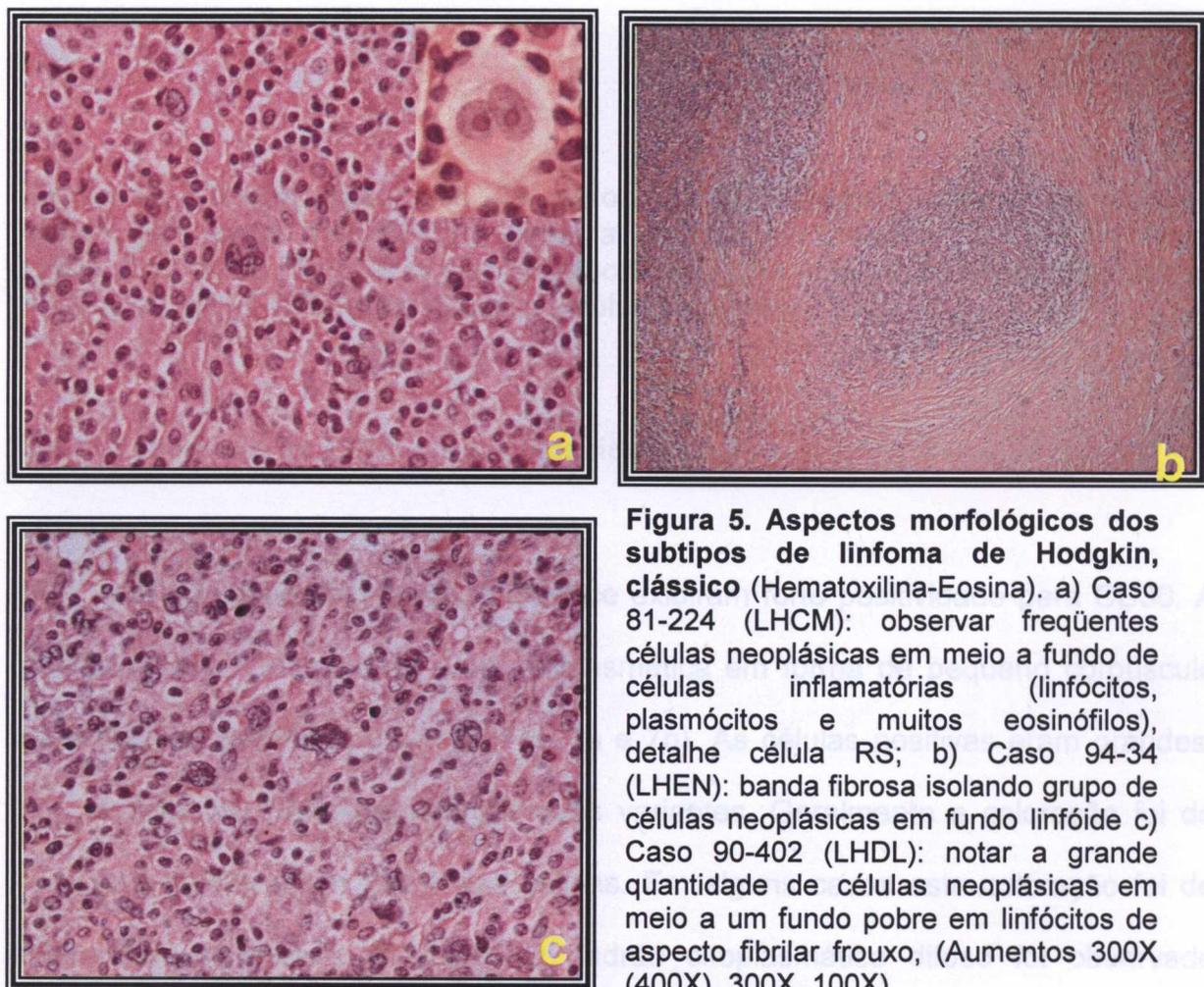
**Figura 4 – Organograma comparativo de diagnóstico:** diagnóstico inicial, baseado no exame histopatológico convencional (H&E) comparado com o diagnóstico após o estudo imunoistoquímico dos casos.

#### 6.4 LINFOMAS DE HODGKIN CLÁSSICO

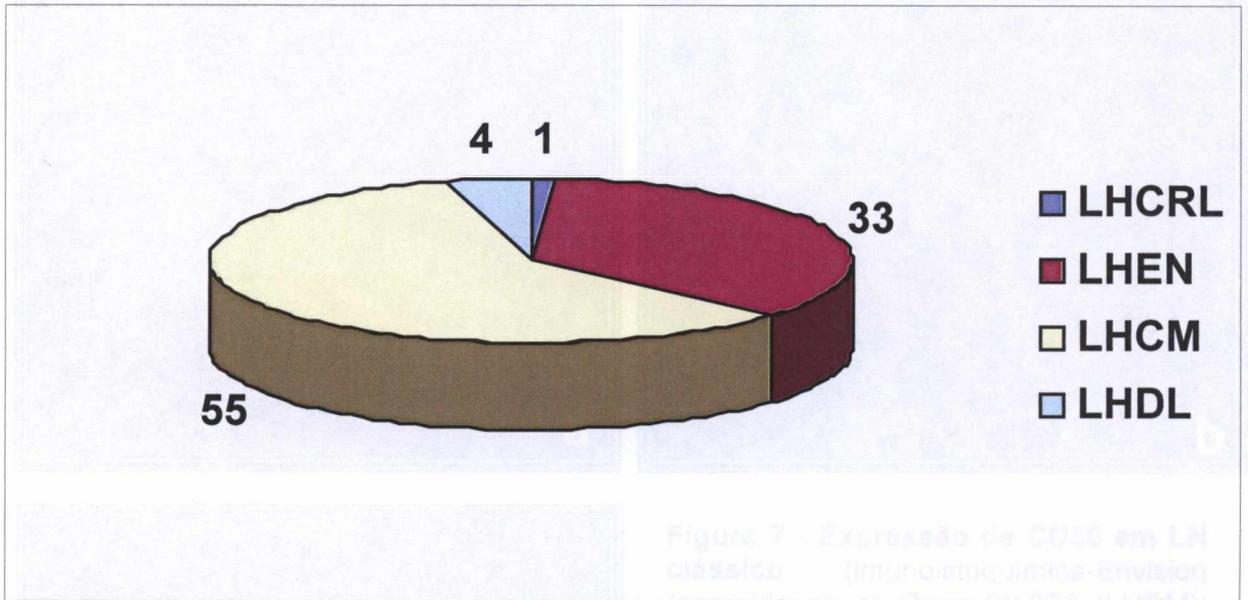
Dos 93 LH clássicos, 55 foram classificados como celularidade mista (Fig. 5a), 33 esclerose nodular (Fig. 5b), quatro depleção linfocítica (Fig. 5c) e um rico em linfócitos.

Dos 55 casos classificados como LHCM, 47 foram diagnosticados morfologicamente, permanecendo inalterado após o estudo imunoistoquímico. Em 8 casos o diagnóstico foi estabelecido após o emprego da imunoistoquímica. Os diagnósticos morfológicos prévios destes 8 casos foram: LHPL em cinco casos, LNHL

em um caso e em dois casos não houve consenso, permanecendo sem classificação. Dos 35 casos diagnosticados inicialmente como LHEN, apenas 33 foram confirmados após o estudo imunoistoquímico, um migrou para o grupo LHPL e outro foi diagnosticado como linfoma não Hodgkin, LAGC. Não houve alteração diagnóstica nos casos 4 casos de LHDL. A distribuição dos casos de LHC por tipo histológico encontra-se representado na Figura 6. Todos estes casos expressaram CD30 e foram negativos ou exibiram positividade focal para CD20.



raramente em algumas células.

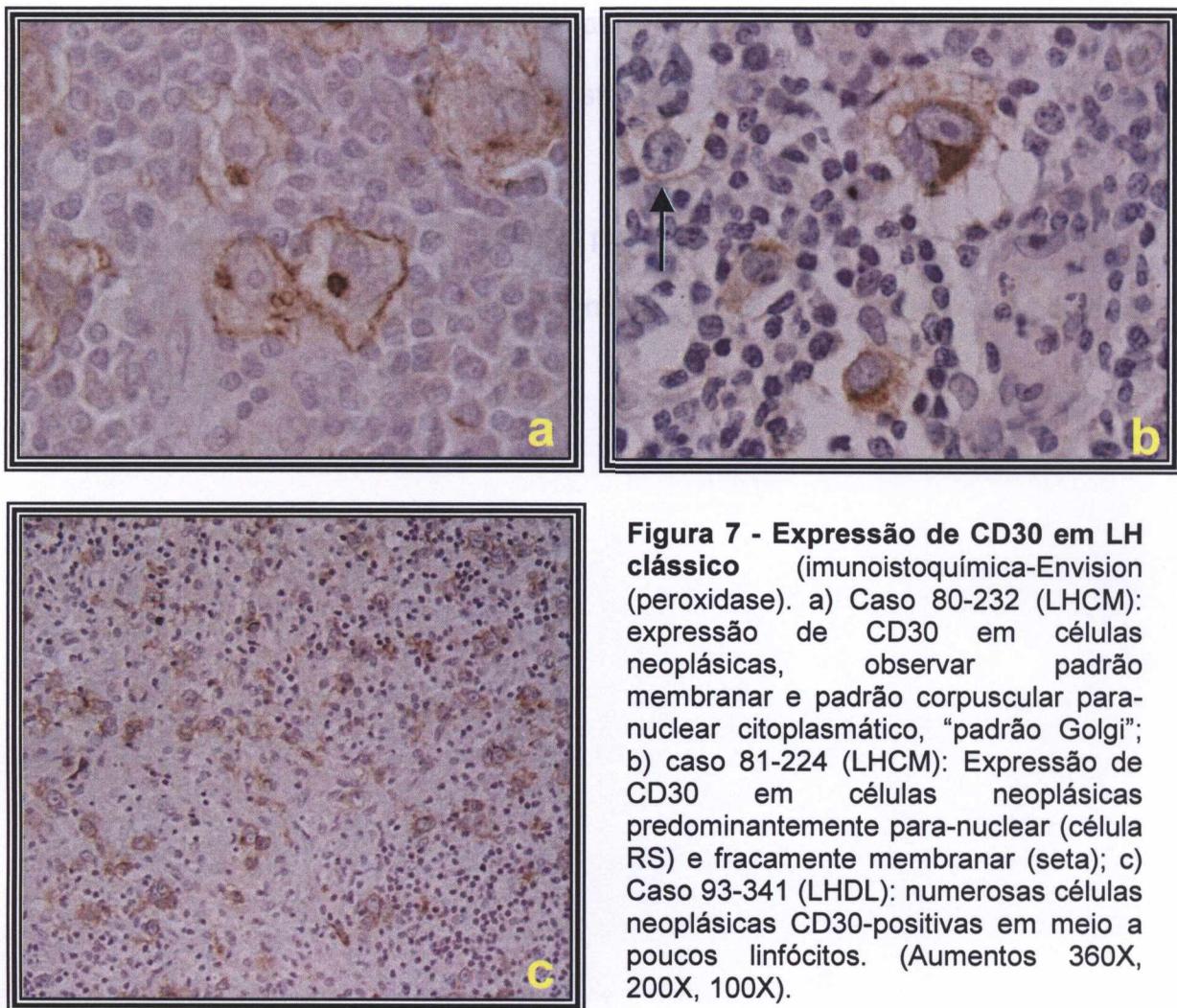


**Figura 6 – Distribuição dos 93 casos de LH clássico quanto ao subtipo histológico após IHQ.** LHCRL: linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos; LHDL: linfoma de Hodgkin depleção linfocítica; LHEN: linfoma de Hodgkin esclerose nodular e LHCM: linfoma de Hodgkin celularidade mista.

#### 6.4.1 Expressão de CD30 em LH clássico

Os 93 casos com fenótipo clássico exibiram forte positividade para CD30. A positividade era membranar e/ou citoplasmática em forma de pequeno corpúsculo para-nuclear “padrão tipo Golgi” (Fig. 7a e 7b). As células positivas eram grandes, tipo Hodgkin ou Reed-Sternberg e suas variantes. Geralmente a coloração foi de forte intensidade e em 100% das células. Em alguns casos esta coloração foi de intensidade moderada ou fraca. O padrão citoplasmático difuso foi observado raramente em algumas células.

Em 16 casos (17%) observou-se expressão de CD20 em células neoplásicas (Fig. 8). Esta expressão foi focal, em grupos de células de RS e suas variantes, em intensidades variáveis, podendo ser observadas células fortemente positivas ao lado de células totalmente negativas (Fig. 8a, 8b e 8c). Em 75 casos (80,65%), as células



**Figura 7 - Expressão de CD30 em LH clássico** (imunoistoquímica-Envision (peroxidase). a) Caso 80-232 (LHCM): expressão de CD30 em células neoplásicas, observar padrão membranar e padrão corpuscular para-nuclear citoplasmático, “padrão Golgi”; b) caso 81-224 (LHCM): Expressão de CD30 em células neoplásicas predominantemente para-nuclear (célula RS) e fracamente membranar (seta); c) Caso 93-341 (LHDL): numerosas células neoplásicas CD30-positivas em meio a poucos linfócitos. (Aumentos 360X, 200X, 100X).

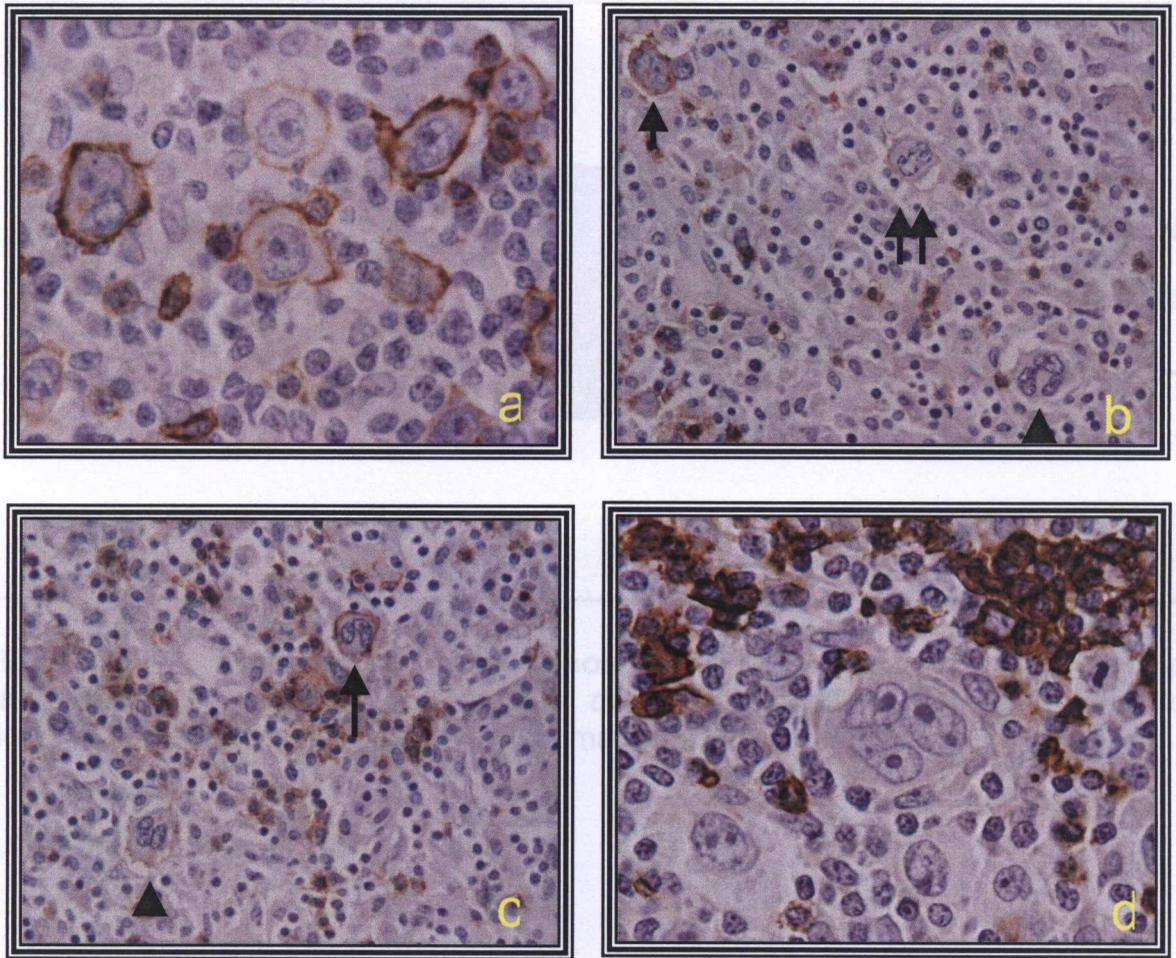
## 6.5 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO LINFÓIDE B EM LH CLÁSSICO

### 6.5.1 Expressão de CD20

Em 18 casos (17%) observou-se expressão de CD20 em células neoplásicas (Fig. 8). Esta expressão foi focal, em grupos de células de RS e suas variantes, em intensidades variáveis, podendo ser observadas células fortemente positivas ao lado de células totalmente negativas (Fig.8a, 8b e 8c). Em 75 casos (80,65%), as células

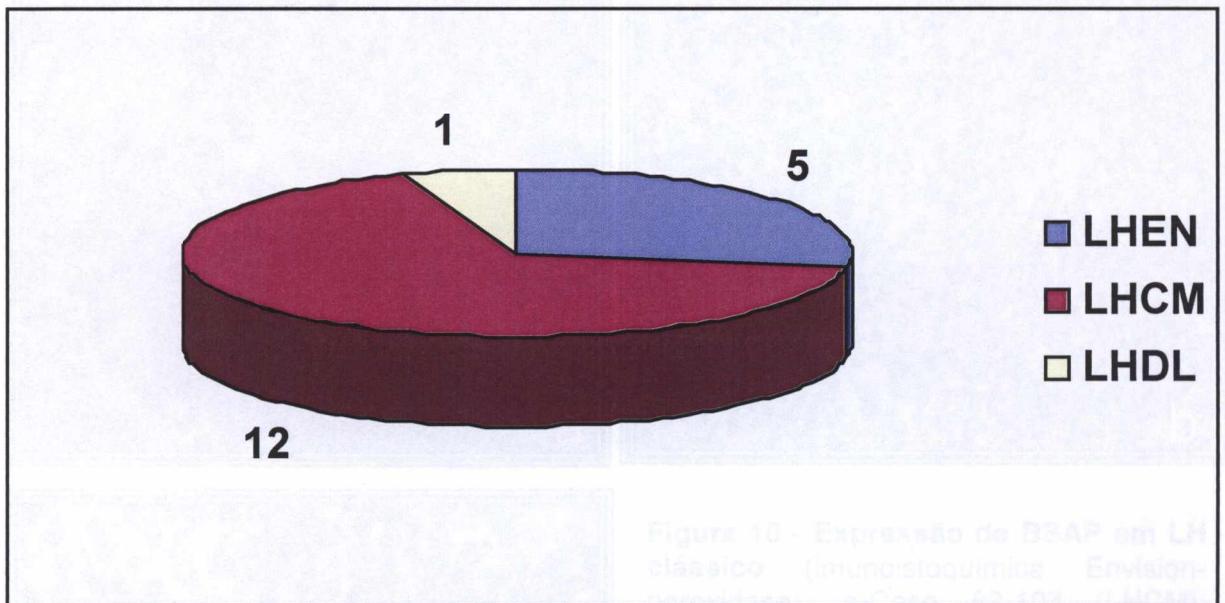
neoplásicas foram totalmente negativas para CD20. Nestes casos, havia linfócitos pequenos reacionais CD20-positivos distribuídos difusamente ou em pequenos aglomerados residuais (Fig. 8d).

Dos 18 casos com positividade para CD20 em células neoplásicas, 12 (66,67%) eram do subtipo celularidade mista, 5 (27,78%) esclerose nodular e 1 (5,55%) depleção linfocítica.



**Figura 8 - Expressão de CD20 em linfoma de Hodgkin clássico** (imunohistoquímica Streptoavidina-biotina-peroxidase.) a) Caso 81-280: forte expressão de CD20 em células neoplásicas e em células linfóides reacionais, b) Caso 83-461: célula neoplásica fortemente positiva para CD20 (seta), célula neoplásica fracamente positiva para CD20 (dupla seta) e célula neoplásica negativa (cabeça de seta), c) Célula neoplásica fortemente positiva para CD20 (seta), célula fracamente positiva (cabeça de seta) em meio a linfócitos B reacionais fortemente positivos para CD20. d) Caso 81- 224: expressão de CD20 exclusivamente em linfócitos reacionais, células neoplásicas negativas. (Aumentos 300X, 100X, 100X, 400X).

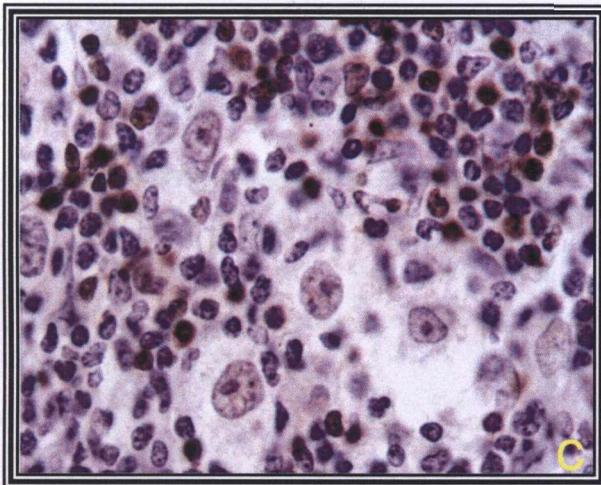
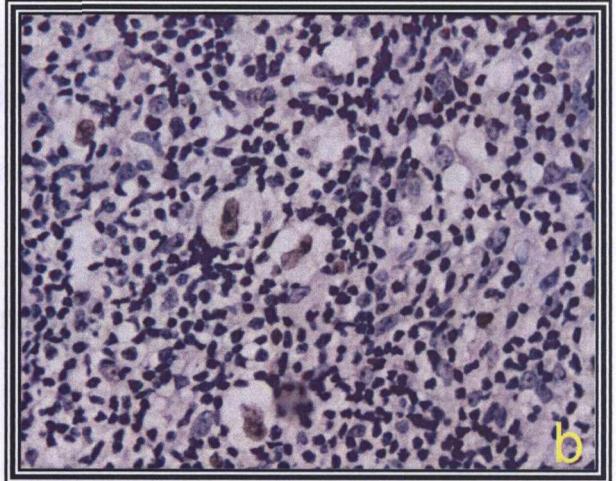
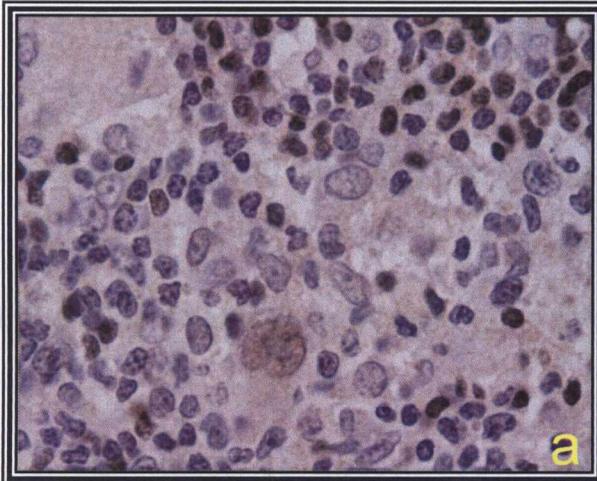
em todos os casos houve uma forte positividade para BSAP em linfócitos pequenos (Fig. 10c), mesmo na área com células neoplásicas negativas. Esta positividade exibiu a mesma distribuição da reação para o CD20 em linfócitos pequenos isolados ou agregados e folículos linfóides residuais. Nove casos (12%) com morfologia e fenótipo clássico foram negativos para BSAP (5 casos LHCM, 3 LHEN e 1 caso LHCRL).



**Figura 9 – Distribuição dos casos LHC CD20-positivo por subtipo histológico.** LHDL: linfoma de Hodgkin depleção linfocítica; LHEN: linfoma de Hodgkin esclerose nodular e LHCM: linfoma de Hodgkin celularidade mista.

### 6.5.1 Expressão de BSAP

Dos 75 casos de LHC negativos para CD20, 66 (88%) exibiram positividade para BSAP. A coloração foi sempre nuclear de intensidade fraca a moderada (Fig. 10a). A quantidade de células neoplásicas positivas foi muito variável (20 a 80%). Quando apenas uma parte das células foi positiva, geralmente estas células estavam próximas umas das outras (10b). Em todos os casos houve uma forte positividade para BSAP em linfócitos pequenos (Fig. 10c), mesmo na área com células neoplásicas negativas. Esta positividade exibiu a mesma distribuição da coloração para o CD20 em linfócitos pequenos isolados ou agregados e folículos linfóides residuais. Nove casos (12%) com morfologia e fenótipo clássico foram negativos para BSAP (5 casos LHCM, 3 LHEN e 1 caso LHCR).



**Figura 10 - Expressão de BSAP em LH clássico** (imunohistoquímica Envision-peroxidase), a) Caso 83-103 (LHCM): coloração nuclear de intensidade moderada em célula RS ao lado de linfócitos B fortemente positivos; b) 89-229 (LHEN) Células neoplásicas próximas positivas para BSAP; c) 81-224: Linfócitos pequenos fortemente positivos para BSAP ao lado de células neoplásicas fracamente positiva para BSAP. (Aumentos 300X, 200X, 300X).

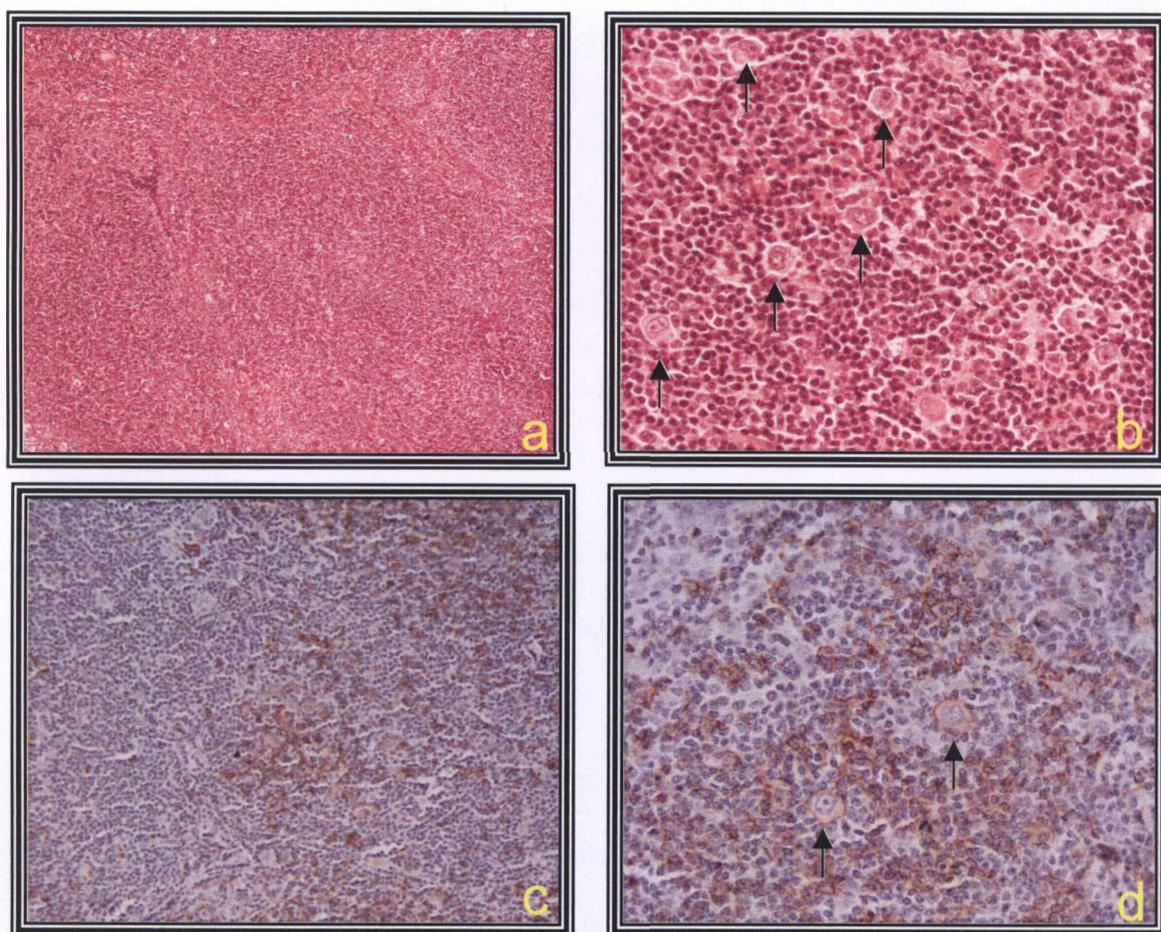
## 6.5 LINFOMA DE HODGKIN PREDOMINÂNCIA LINFOCÍTICA

Dos de 14 casos de LHPL, 10 exibem morfologia compatível com este subtipo, sendo reconhecidos com base no exame histopatológico, porém em quatro casos foi necessário o estudo IHQ. Estes 4 casos haviam sido anteriormente interpretados como LHCM (1 caso), LHEN (1 caso) e dois não foram classificados por não haver consenso entre os patologistas consensuais quanto ao diagnóstico morfológico. O caso interpretado como LHCM, tratava-se de comprometimento linfonodal estendendo-se a pele que se encontrava ulcerada, rica em vasos, linfócitos, plasmócitos (tecido de granulação) levando a um fundo inflamatório misto.

6.6.2 Desses 14 casos de LHPL, 12 (85,71%) exibiram morfologia nodular (Fig. 11a e 11b) e 2 (14,29%) exibiam morfologia difusa. Estes casos mostraram forte expressão de CD20 em 100% das células neoplásicas e negatividade para CD30.

### 6.6.1 Expressão de marcadores de diferenciação linfóide B (CD20) em LHPL

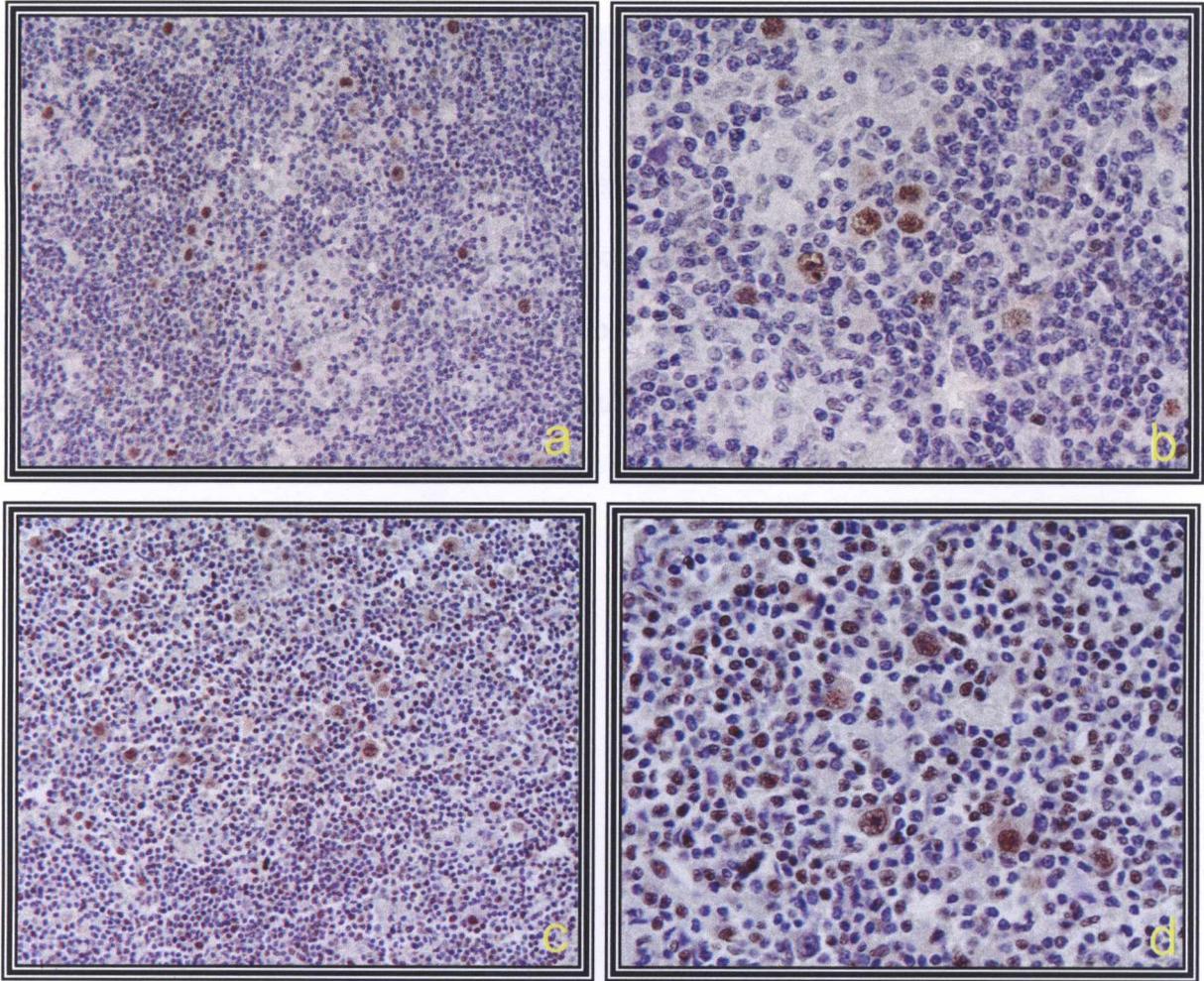
Em todos os casos, 100% das células neoplásicas apresentaram forte positividade para CD20 (Fig. 11c e 11d). As células neoplásicas dispunham-se na periferia e interface de agregados de linfócitos B pequenos também CD20-positivos.



**Figura 11 – Aspectos morfológicos e imunofenotípicos de LHPL (HE e imunoistoquímica pelo método: ABC-peroxidase para CD20). a) Caso 94-388: aspecto esboçando nódulos de limites pouco nítidos; b) Caso 94-388: células mononucleadas grandes neoplásicas (setas) em meio a linfócitos c) Expressão de CD20 em linfócitos reacionais e células neoplásicas L&H que constituem os nódulo; d) Expressão de CD20 em linfócitos reacionais e células neoplásicas L&H (setas) (Aumentos 100X, 200X, 100X, 250X)**

### **6.6.2 Expressão dos marcadores linfóides B, Oct-2 e BOB.1 em LHPL**

Em 13 dos 14 casos foi realizada a pesquisa para Oct-2 e BOB.1. Em todos eles havia co-expressão destes antígenos. A expressão do BOB.1 era forte em todas as células neoplásicas e em grande número de linfócitos pequenos reacionais (Fig. 12a e 12b). A expressão de Oct-2 foi observada em todas as células neoplásicas e em um número muito pequeno dos linfócitos reacionais (Fig. 12c e 12d). Em um caso não foi possível, por motivos técnicos, realizar a pesquisa de Oct-2 e BOB.1.



**Figura 12 - Expressão de Oct-2 e BOB-1 em LHPL (técnica Peroxidase-Envision). a) e b) caso 98-519 : expressão de Oct-2 predominantemente em células neoplásicas e poucos linfócitos reacionais de fundo; c e d) Caso 98 -519: expressão de BOB-1 em células neoplásicas e numerosos linfócitos reacionais.**

## 6.6 LINFOMA NÃO HODGKIN: LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES

Apenas um caso, diagnosticado em 1973 como esclerose nodular subtipo depleção linfocítica e que a revisão histológica demonstrou morfologia compatível com esclerose nodular grau 2 versus linfoma de Hodgkin LACG-símile foi positivo para proteína ALK-1 e CD30. Este caso exibia nódulo delimitado por fibrose densa e constituído por um sincício de células neoplásicas grandes semelhantes a células lacunares, entremeado por poucas células inflamatórias.

## 6.8 CASO NÃO CLASSIFICADO IMUNOFENOTIPICAMENTE

Um único caso (128-94), CD20 negativo, BSAP positivo, resultou CD30 negativo, mesmo após repetições com controle positivo. Neste caso foi realizado CD15 que resultou positivo forte em todas as células neoplásicas. Este caso apresentou morfologia compatível com celularidade mista.

## 7 DISCUSSÃO

A ocorrência do linfoma de Hodgkin no grupo pediátrico exibe diferentes aspectos em regiões geográficas distintas, incluindo idade de aparecimento da doença, distribuição quanto ao sexo, predomínio de determinados subtipos histológicos e associação viral. Embora este linfoma tenha origem, predominantemente em células B, apenas uma parte dos casos exibe fenótipo B. Assim, em 2001, a nova classificação da OMS para linfoma de Hodgkin reconheceu dois imunofenótipos distintos de LH: um muito semelhante a outros linfomas B (CD30-, CD20+) e outro denominado clássico (CD30+, CD20+/-). O objetivo do nosso trabalho foi estudar o fenótipo em 109 casos consecutivos diagnosticados como linfoma de Hodgkin no Serviço de Anatomia Patológica do hospital pediátrico Martagão Gesteira da Liga Baiana Contra Mortalidade Infantil, correlacionando-os com alguns aspectos epidemiológicos.

### 7.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Dos 109 casos estudados, 108 exibiram fenótipo de linfoma de Hodgkin, sendo que 85 destes eram do sexo masculino e 23 do sexo feminino, proporção 3,7:1. Dados da literatura mostram que o linfoma de Hodgkin é mais freqüente em meninos que em meninas (STILLER, 1998). A proporção varia nas diferentes regiões geográficas, de 5:1 na Costa Rica, África do Sul e Egito, 2,7:1 na Inglaterra, 2,9:1 no Quênia até 1,5 na Jordânia e Grécia (WEINREB, 1996). Entretanto, algumas destas séries são pequenas e a diferença não é estatisticamente significativa.

No nosso estudo, observamos uma maior frequência do sexo masculino no subtipo LHEN e LHPL de 7:1 e 6,5:1 respectivamente, enquanto apenas 2,7:1 no subtipo LHCM. A susceptibilidade do sexo masculino para linfomas é conhecida também em linfomas não Hodgkin. Fatores genéticos podem estar relacionados a esta susceptibilidade, pois estudos comparativos entre pares de gêmeos monozigóticos e dizigóticos apontam para uma maior frequência do LH nos pares monozigóticos masculinos, indicando que fatores genéticos desempenhem papel importante (MACK, 1995).

Dos 108 casos de linfoma de Hodgkin, 72 casos (67,6%) ocorreram dos 3 aos 10 anos de idade e 36 casos entre 11 e 16 anos ( $p=0,55$ ). Este resultado é semelhante ao observado em outras séries de países em desenvolvimento onde 70% dos casos ocorrem abaixo dos 10 anos de idade (STILLER, 1998). Em contraste, países desenvolvidos exibem uma maior frequência em pacientes entre 10-14 anos (STILLER, 1998). A baixa idade tem sido relacionada ao subtipo celularidade mista. No nosso estudo, dos 55 casos diagnosticados como LHCM, 37 ocorreram antes dos 10 anos de idade e dos 33 casos de LHEN, 22 ocorreram antes dos 10 anos de idade, sem diferença significativa, ( $p=0,6$  e  $0,56$ ).

## 7.2 LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

Dos 108 casos diagnosticados como LH, em 107 foi possível confirmar morfologia e imunofenótipo de LH, sendo 93 LH clássico com expressão de CD30 e 14 LHPL. Um caso foi CD30- e CD15+, sendo considerado não classificável. Dos 93 casos que expressavam CD30, 55 eram do subtipo LHCM, 33 LHEN, 4 LHDL, 1 LHCRL.

O diagnóstico dos subtipos histológicos tem sofrido ao longo dos anos, influencia da introdução de novos critérios adotados. O diagnóstico do subtipo esclerose nodular pelo grupo Australiano-Germânico para o estudo do LH, por exemplo, aumentou de 47% entre 1978-84 para 63% entre 1990-95 (STILLER, 1998). Em um estudo no Brasil, cerca de metade de 30 casos diagnosticados inicialmente como celularidade mista foram re-classificados em 1996 como esclerose nodular (FARIA et al, 1996). A necessidade de septo completo para diagnóstico de LHEN, estabelecido pela OMS 2001, levou no nosso material a um resultado oposto, i.e., casos inicialmente diagnosticados como esclerose nodular foram re-classificados como CM. A quantidade do material parece também importante para classificação, visto que casos sem nódulos completos nas lâminas de recorte exibiram nódulo na lâmina original. A proporção de 51% de LHCM é menor que a frequência deste subtipo no grupo pediátrico em outros países em desenvolvimento (PEH et al, 1997). Em países desenvolvidos e em regiões do Sudeste do Brasil, o subtipo esclerose nodular tem sido descrito em maior frequência que o celularidade mista (FARIA et al, 1996), portanto a frequência dos subtipos de LH no nosso meio parece intermediária entre as áreas desenvolvidas e subdesenvolvidas. Em alguns países em desenvolvimento, o subtipo LHCM compreende quase 100% dos casos e está associado à infecção pelo EBV em virtualmente todos os casos (RAZZOUK et al., 1997). Em um trabalho anterior envolvendo parte do nosso material, mostrou-se uma frequência da infecção pelo EBV no subtipo celularidade mista em quase 100% dos casos (BARBOSA et al., 2003).

### 7.3 EXPRESSÃO DE MARCADORES B EM LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

Apesar dos linfomas de Hodgkin exibirem, na sua maioria, genótipo B, apenas uma pequena parte expressam marcadores linfóides B de superfície (STEIN et al., 2001). No LH clássico, definido pela constante expressão de CD30 em células neoplásicas, uma variável proporção de células foi positiva para CD20 em 18/93 (17,35%). Duas teorias tentam explicar a ausência de marcadores de superfície de células B no LH clássico: a) A presença de mutações que levariam a seqüências de parada de transcrição de imunoglobulinas e antígenos relacionados (KÜPPERS et al., 1994); b) defeito na produção de fatores de transcrição de células B ou seu co-ativador, no caso BOB.1 e Oct-2 (MARAFIOTI et al., 2000). Trabalhos recentes entretanto, demonstram que a segunda teoria parece mais provável, já que as mutações estão presentes em menos de 25% dos casos (MARAFIOTI et al., 2000), o que não explicaria a ausência de marcadores B em mais de 50% dos casos. A expressão do CD20 tem sido referida em até 80% dos casos em algumas casuísticas. No nosso material, entretanto, apenas 17 % exibiram esta positividade. O CD20 sempre funcionou adequadamente e exibia forte controle interno, o que desfavorece problemas técnicos. Alguns trabalhos referem-se à supressão do perfil de expressão antigênica, especialmente marcador de célula B, na presença da infecção pelo EBV (HERBST et al., 1996). Considerando que no nosso meio 86% dos LH pediátricos exibe infecção pelo EBV (ARAÚJO et al., 2000), este poderia ser um resultado desta modulação.

Um marcador B presente na maioria dos casos foi o BSAP. Este marcador, no entanto, não nos pareceu ser de fácil aplicabilidade, pois gerou colorações nucleares de fraca a moderada intensidade, e, por vezes, focal de difícil interpretação. Nossos

achados são semelhantes aos resultados de Foss et al. (1999). A negatividade do BSAP pode estar relacionada à perda deste fator como observado para BOB.1 ou Oct-2, porém pode estar relacionado ao fenótipo/genótipo T do LH. Entretanto, apenas cerca de 1% dos LH casos exibem genótipo T (MÜSCHEN, et al, 2000).

Em um caso não foi possível fazer classificação imunofenotípica devido à negatividade para CD30 e CD20, no entanto, expressou BSAP focalmente e era fortemente positivo para CD15 em 100% das células neoplásicas. Diante da negatividade para CD30 preferimos não classificar o caso, embora a positividade para CD15 e BSAP permita concluir que se trate da forma clássica de LH. Não há dados de literatura sobre a negatividade de CD30 em LH, sendo este achado, na maioria das vezes, atribuído a problemas técnicos. No nosso material, o controle externo era fortemente positivo e outros casos foram positivos no mesmo experimento; a reação foi repetida pelo menos três vezes, minimizando a possibilidade de erros técnicos. Achemos, portanto, que realmente existem casos de LH CD30 negativos. Esta observação tem sido relatada em congressos (comunicação pessoal).

#### 7.4 LINFOMA DE HODGKIN PREDOMINÂNCIA LINFOCÍTICA

Dos 108 casos de LH, 14 (13%) eram LHPL. Estes marcadores resultaram em forte coloração nas células neoplásicas e no controle interno (linfócitos). A expressão do BOB.1, principalmente em linfócitos reacionais foi nitidamente superior à do Oct-2. A porcentagem de 13 % de LHPL situa-se acima da descrita em LH pediátricos no Quênia (3%) (WEINREB, et al., 1996), porém nitidamente abaixo da descrita para uma população multi-étnica na Malásia, onde 26% (9/34) dos casos foram

classificados como LHPL (PEH et al., 1997). Entretanto, estudos da frequência deste subtipo na população pediátrica ainda são restritos e freqüentemente referem-se ao subtipo predominância linfocítica da classificação Ray, sem estudo imunofenotípico. No nosso estudo este subtipo ocorreu predominantemente no sexo masculino, na classificação da OMS de 2001.

## 7.5 LINFOMA ANAPLÁSICO DE CÉLULAS GRANDES

Um único caso, CD20 e BSAP negativo, exibiu positividade para CD30 e ALK-1, confirmando o fenótipo de LACG. Este caso havia sido classificado em 1973 como LH, subtipo depleção linfocítica da EN, de acordo com a literatura da época (CIONINI et al., 1978; PATCHEFKY et al., 1973; KELLER et al., 1968).

O reconhecimento do LACG como uma entidade foi estabelecido na década de 80 e a maioria destes casos tinha sido classificada como LH ou carcinomas indiferenciados (STEIN et al., 2000). Sabe-se que LH exibem aspecto morfológico e até fenotípico semelhante ao LACG (CHITTAL; DESOL, 1997). O critério mais seguro para o diagnóstico diferencial é a expressão da proteína ALK-1 (STEIN et al., 2000). Nos casos pediátricos esta proteína está presente em até 83% dos LACG, enquanto nos casos adultos apenas 31 % a expressam (DEXLER et al., 2000). No caso da ausência desta proteína, a expressão de marcadores linfóides B deveria excluir esta entidade, já que os LACG são exclusivamente linfomas de fenótipo T/nulo (STEIN et al., 1995, CHAN et al., 1989, PENNY et al., 1991).

Em alguns casos, os limites morfológicos e imunofenotípicos entre LACG e LH não são claros (STEIN et al, 1992, CHITTAL & DELSOL, 1997; STEIN, 1999, FIZZERA, 1992), correspondendo a uma zona de interseção entre estas entidades.

Isto poderia levar a equivocadas interpretações quanto a sua classificação. No nosso estudo, nove casos (8,25%) dos 109 avaliados, correspondiam a esta zona de intersecção do fenótipo entre LACG e LH; estes casos foram negativos para marcadores de células B (CD20 e BSAP). Esta percentagem de negatividade para BSAP é semelhante à descrita por Foss et al. (1999). Estes casos foram também negativos para ALK-1. Considerando que a positividade para ALK-1 no grupo pediátrico atinge quase 90% dos casos (DREXLER et al., 1997), a ausência de ALK-1 aliada a aspectos morfológicos permitiu o diagnóstico de LH clássico.

## 7.6 CORRELAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOLÓGICOS COM O ESTUDO IMUNOISTQUÍMICO

Considerando a revisão inicial das lâminas sem o estudo imunoistoquímico foi possível o diagnóstico correto em 94 casos (86,2%). Em 15 casos (13,7%) houve alteração do diagnóstico após o estudo IHQ. Resultado semelhante foi descrito por Anagnostopoulos et al. (2000) o qual trabalhou com 388 casos diagnosticados inicialmente como LHPL. Desconsiderando os casos sem consenso, eles encontram uma concordância de 73,7% e discordância de 26% entre a revisão do diagnóstico morfológico, utilizando apenas H&E e após o emprego da IHQ. A maior discrepância entre o estudo morfológico e imunofenotípico nesta série pode ser atribuída à origem dos casos pesquisados, pois participaram desse estudo 16 centros oncológicos de países distintos.

A faixa etária restrita ao grupo pediátrico, a precisa indicação de biópsia e os critérios morfológicos rígidos para o diagnóstico inicial, base para seleção dos

nossos casos, são os possíveis responsáveis pela maior concordância do diagnóstico morfológico versus o imunofenotípico.

## 8 CONCLUSÃO

1. O LH ocorreu predominantemente em crianças do sexo masculino (77,98%) ( $p < 0,01$ ) e abaixo dos 10 anos de idade (67%) ( $p=0,53$ ), sendo semelhante ao encontrado em países em desenvolvimento;
2. O LH clássico compreendeu a maioria dos casos (85,32%), sendo o subtipo LHCM (51%) o mais freqüente;
3. A freqüência de LHPL foi relativamente alta no grupo pediátrico: 12,84 e, como ocorre em adultos, ocorre principalmente no sexo masculino;
4. O uso do estudo imunoistoquímico alterou o diagnóstico morfológico inicial em 13,7% dos, sendo indispensável para o diagnóstico diferencial entre o LH clássico e o LHPL;
5. A sobreposição do diagnóstico morfológico entre LACG e LH foi pequena, sendo que apenas 1(um) caso de LACG, com positividade para ALK-1, foi identificado neste material (0,9%);
6. Os marcadores de diferenciação linfóide B (CD20 e BSAP) permitiram o diagnóstico diferencial entre LH e LACG em 90% dos casos, porém 9 casos (8,3%) foram negativos para estes marcadores, situando-se na zona de interseção do fenótipo entre estas entidades;
7. Um único caso (128-94) resultou CD30 negativo indicando que, provavelmente, existam raros casos (1%) LH CD30 negativos, porém outros estudos são necessários para confirmar esta observação.

## REFERÊNCIAS

ADAMS; DORFLER, P.; AGUZZI, A.; KOZMIK, Z.; URBANEK, P.; MAURER-FOGY, I.; BUSSLINGER, M. Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. **Genes Dev.**, **61**:589-607,1992.

AGNARSSON, B. A.; KADIN, M. E. Ki-1 positive large cell lymphoma: a morphologic and immunologic study of 19 cases. **Am. J. Surg. Pathol.**, **12**:264-267, 1988.

AISENBERG, A. C. Problems in Hodgkin's disease management. **Blood**, **93**:761-779, 1999.

AMBINDER, R.F.; GRIFFIN, C.A. Biology of the lymphomas: cytogenetics, molecular biology, and virology. **Curr. Opin. Oncol.**, **3**:806-812, 1991.

ANAGNOSTOPOULOS, I.; HANSMANN, M.L.; FRANSSILA, K.; HARRIS, M.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; HAN, J.; VAN KRIEKEN, J. M.; POPPEMA, S.; MARAFIOTI, T.; FRANKLIN, J.; SEXTRO, M.; DIEHL, V.; STEIN, H. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominant Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. **Blood**, **96**:1889-1899, 2000.

ANDREESEN, R.; BRUGGER, W.; LOHR, G. W.; BROSS, K J. Human macrophages can express the Hodgkin's cell-associated antigen Ki-1 (CD30). **Am. J. Pathol.**, **134**:187-192,1989.

ARAUJO, I.; FOSS, H.D.; HUMMEL, M.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; BARBOSA, H.S.; BITTENCOURT, A.; STEIN, H. Frequent expansion of Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in germinal centres of tonsils from an area with a high incidence of EBV-associated lymphoma. **J. Pathol.**, **187**:326-330. 1999.

ARAUJO, I., VIANA, M. S., BITTENCOURT, A. L., MENDONÇA, N., BARBOSA, H. S. Alta frequência da infecção pelo vírus de Epstein Barr em casos de doença de Hodgkin na Bahia In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CANCEROLOGIA, 15., 2000, Salvador.

BANCHEREAU, J.; DE PAOLI, P.; VALLE, A.; GARCIA, E.; ROUSSET, F. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. **Science**, **251**:70-72, 1991.

BARBERIS, A.; WIDENHORN, K.; VITELLI, L.; BUSSLINGER, M. A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stages of differentiation. **Genes Dev.**, **4**:849-859, 1990.

BARBOSA, H.S. **Linfoma e leucemias associadas à infecção pelo HTLV-I no estado da Bahia**. 1997. 124f. Tese (Doutorado em Patologia Humana)- Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BARBOSA, H. S., VIEIRA, M. G. S., JALIL, E. M., BITTENCOURT, A. L., ARAUJO, I. Estudo imunoistoquímico e classificação da OMS de 324 casos consecutivos de linfoma In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, 24., 2003, Florianópolis; **J. Bras. Patol.**, **39**:90, 2003.

BENHARROCH, D.; MEGUERIAN-BEDOYAN, Z.; LAMANT, L.; AMIN, C.; BRUGIERES, L.; TERRIER-LACOMBE, M.J.; HARALAMBIEVA, E.; PULFORD, K.; PILERI, S.; MORRIS, S. W.; MASON, D.Y.; DELSOL, G. ALK positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. **Blood**, **91**:2076-2084, 1998.

BERNARD, C. W.; THOMAS, L. B.; AXTELL, L. M.; KRUSE, M.; NEWELL, G., KAGAN R. The Relationship of histological subtype to clinical stage of Hodgkin's disease at diagnosis. **Cancer Res.**, **31**:1776-1785, 1971.

BITTENCOURT, A. L.; BARBOSA, S. H. Pediatric Hodgkin's disease in Bahia. **Brazil Oncl. (Life Sci. Adv.)**. **11**:45-49, 1992.

BITTER, M. A.; FRANKLIN, W. A.; LARSON, R. A.; MCKEITHAN, T. W.; RUBIN, C. M.; L. E BEAU, M. M.; STEPHENS, J. K.; VARDIMAN, J. W. Morphology in Ki-1(CD30)-positive non-Hodgkin's lymphoma is correlated with clinical features and the presence of a unique chromosomal abnormality, t(2;5)(p23;q35). **Am. J. Surg. Pathol.**, **14**:305-316, 1990.

BROUSSET, P.; BENHARROCH, D.; KRAJEWSKI, S.; LAURENT, G.; MEGGETTO, F.; RIGAL-HUGUET, F.; GOPAS, J.; PRINSLOO, I.; PRIS, J.; DELSOL, G.; REED, J.C.; SCHLAIFER, D. Frequent expression of the cell death-inducing gene Bax in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Blood**, **87**:2470-2475, 1996.

- BUSSLINGER, M.; URBÁNEK, P. The role of BSAP (Pax-5) in B-cell development. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, 5:595, 1995.
- BUTLER J. J. The histologic diagnosis of Hodgkin's disease. **Semin. Diagn. Pathol.**, 9:252-256, 1992.
- BUTLER, J. J. Relationship of histological finding to survival in Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, 31:1770-1775, 1971.
- CAMBIAGGI, A.; CANTONI, C.; MARCIANO, S.; DE TOTERO, D.; PILERI, S.; TAZZARI, P. L.; STEIN, H.; FERRINI, S. Cultured human NK cells express the Ki-1/CD30 antigen. **Br. J. Haematol.**, 85:270-276, 1993.
- CABANILLAS, F.; PATHAK, S.; TRUJILLO, J.; GRANT, G.; CORK, A.; HAGEMEISTER, F.B.; VELASQUEZ, W.S.; MCLAUGHLIN, P.; REDMAN, J.; KATZ, R. Cytogenetic features of Hodgkin's disease suggest possible origin from a lymphocyte. **Blood**, 71:1615-1617, 1988.
- CARBONE, A.; GLOGHINI, A.; GATTEI, V.; ALDINUCCI, D.; DEGAN, M.; DE PAOLI, P.; ZAGONEL, V.; PINTO, A. expression of functional CD40 antigen on Reed Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. **Blood**, 85:780-789, 1995.
- CHAN, J.K.; NG, C.S.; HUI, P.K.; LEUNG, T.W.; LO, E.S.; LAU, W.H.; MCGUIRE, L.J. Anaplastic large cell Ki-1 lymphoma: delineation of two morphological types. **Histopathology**, 15:11-34, 1989.
- CHANG, J. F.; PHILLIPS, K.; LUNDBACK, T.; GSTAIGER, M.; LADBURY, J.E.; LUISI, B. Oct-1 POU and octamerDNA cooperate to recognise the Bob-1 transcriptioncoactivator via induced folding. **J. Mol. Biol.**, 288:941-952, 1999.
- CHANG, K. L.; KAMEL, O.W.; ARBER, D. A.; HORYD, I. D.; WEISS, L. M. Pathologic features of nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease in extranodal sites. **Am. J. Surg. Pathol.**, 19:1313-1324, 1995.
- CHITTAL, S.M.; DELSOL, G. The interface of Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. **Cancer Surv.**, 30:87-105, 1997.
- CHU, A.G.; ARBER, D.A. CD79: a review. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, 97-106, 2001.

CIONINI, L., ARGANINI, L., MUNGAI, V., BITI, G.P., BONDI, R. Prognostic significance of histologic subdivision of Hodgkin's disease nodular sclerosis. **Acta Radiol. Oncol. Radiat. Phys. Biol.**, **17**:65-73, 1978.

CLEARY, M. L.; SKLAR, J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. . **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**:7439-7443, 1985.

COLBY, T. V.; HOPPE, R. T., WARNKE, R.NA. Hodgkin's disease: a clinicopathologic study of 659 cases. **Cancer**, **49**:1848-1858, 1982.

COPPLESON, L. W.; RAPPAPORT, H.; STRUM, S. B.; ROSE J. Analysis of the Rey classification of Hodgkin's disease: the prognostic significance of cellularf composition. **J. Natl. Cancer Inst.**, **51**:379-390, 1973.

CORREA, P.; O'CONOR, G. T. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease **Int. J. Cancer**, **8**:192-201, 1971.

DREXLER, H.G.; GIGNAC, S.M.; VON WASIELEWSKI, R.; WERNER, M.; DIRKS, W.G. Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. **Leukemia**, **14**: 1533-1559, 2000.

DORFMAM, R. F. Relationship of histology to site in Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, **31**:1776-1793, 1971.

ELGUI, O. D.; BACCHI, M.M.; ABREU, E.S.; NIERO-MELO, L.; BACCHI, C.E. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil: characterization of clinicopathologic aspects and relationship with Epstein-Barr virus infection. **Am. J. Clin. Pathol.**, **118**:25-30, 2002.

FALINI, B.; LISO, A.; PASQUALUCCI, L.; FLENGHI, L.; ASCANI. S.; PILERI, S.; BUCCIARELLI, E. CD30+ anaplastic large-cell lymphoma, null type, with signet-ring appearance. **Histopathology**, **30**:90-92, 1997.

FALINI, B.; PILERI, S.; PIZZOLO, G.; DURKOP, H.; FLENGHI, L.; STIRPE, F.; MARTELLI, M. F.; STEIN, H. CD30(Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. **Blood**, **85**:1-14, 1995.

FALINI, B.; BIGERNA, B.; FIZZOTTI, M.; PULFORD, K.; PILERI, S. A.; DELSOL, G.; CARBONE, A.; PAULLI, M.; MAGRINI, U.; MENESTRINA, F.; GIARDINI, R.;

PILOTTI, S.; MEZZELANI, A.; UGOLINI, B.; BILLI, M.; PUCCIARINI, A.; PACINI, R.; PELICCI, P. G.; FLENGHI, L. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. **Am. J. Pathol.**, **153**:875-886, 1998.

FALINI, B., PILERI, S., ZINZANI, P., CARBONE, A., ZAGONEL, V., PEETERS, C., VERHOEF, G., MENESTRINA, F., TODESCHINI, G., PAULLI, M., LAZZARINO, M., GIARDINI, R., AIELLO, A., FOSS, H.-D., ARAUJO, I., FIZZOTTI, M., PELICCI, P., FLENGHI, L., MARTELLI, M., SANTUCCI, A. ALK-1 Lymphoma: Clinico-Pathological Findings and Outcome. **Blood**, **93**:2697-2706, 1999.

FARIA, S.L., VASSALLO, J., COSSET, J.M., BRANDALISE, S.R. Childhood Hodgkin's disease in Campinas, Brazil. **Med. Pediatr. Oncol.**, **26**:90-94, 1996.

FELGAR, R.E.; SALHANY, K.E.; MACON, W.R.; PIETRA, G.G.; KINNEY, M.C. The expression of TIA-1+ cytolytic-type granules and other cytolytic lymphocyte-associated markers in CD30+ anaplastic large cell lymphomas (ALCL): correlation with morphology, immunophenotype, ultrastructure, and clinical features. **Hum. Pathol.**, **30**:228-36, 1999.

FERRY, J. A.; LINGGOOD, R. M.; CONVERY, K. M.; EFIRD, J. T.; ELISEO, R.; HARRIS NL. Hodgkin's disease, nodular sclerosis types: implications of histologic subclassification. **Cancer**, **71** :457-463, 1993.

FILIPPA, D. A.; LADANYI, M.; WOLLNER, N.; STRAUS, D. J.; O'BRIEN, J. P.; PORTLOCK, C.; GANGI, M.; SUN, M. CD30 (Ki-1)-positive malignant lymphomas; clinical, immunophenotypic, histologic, and genetic characteristics and differences with Hodgkin's disease. **Blood**, **87**:2905-2917, 1996.

FLAVELL, K. J.; BIDDULPH, J. P.; CONSTANDINO, C. M.; LOWE, D.; SCOTT, K.; CROCKER, J.; YOUNG, L. S.; MURRAY, P.G. Variation in the frequency of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease with age. **Leukemia**, **14**:748-753, 2000.

FOSS, H. D.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; ARAUJO, I.; ASSAF, C.; DEMEL, G.; KUMMER, J. A.; HUMMEL, M.; STEIN H. Anaplastic large-cell lymphomas of T-cell and null-cell phenotype express cytotoxic molecules. **Blood**, **88**:4005-4011, 1996.

FOSS, H.-D., REUSCH, R., DEMEL, G., LENZ, G., ANAGNOSTOPOULOS, I., HUMMEL, M., STEIN, H. Frequent Expression of the B-Cell-Specific Activator Protein in Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Disease Provides Further Evidence for Its B-Cell Origin. **Blood**, **94**:3108-3113, 1999.

FRIZZERA, G.; WU, C. D.; INGHIRAMI, G. The usefulness of immunophenotypic and genotypic studies in the diagnosis and classification of hematopoietic and lymphoid neoplasms: an update **Am. J. Surg. Pathol.**, **23**:S13-S39, 1999. Suppl. I.

FRIZZERA, G. The distinction of Hodgkin's disease from anaplastic large cell lymphoma. **Semin. Diagn. Pathol.**, **9**:291, 1992

GARCIA-SANZ, J. A.; MACDONALD, H. R.; JENNE, D. E.; TSCHOPP, J.; NABHOLZ, M. Cell specificity of granzyme gene expression. **J. Immunol.**, **145**:3111-3118, 1990.

GAUWERKY, C.E.; HALUSKA, F.G.; TSUJIMOTO, Y.; NOWELL, P.C.; CROCE, C.M. Evolution of B-cell malignancy: pre-B-cell leukemia resulting from MYC activation in a B-cell neoplasm with a rearranged BCL2 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **85**:8548-8552, 1988.

GOEDERT, J. J.; COTE, T. R.; VIRGO, P.; SCOPPA, S. M.; KINGMA, D. W.; GAIL, M. H.; JAFFE, E. S.; BIGGAR, R. J. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. **Lancet**, **351**:1833-1839, 1998.

GUPTA, R.K.; NORTON, A.J.; THOMPSON, I.W.; LISTER, T.A.; BODMER, J.G. p53 expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Br. J. Cancer**, **66**:649-652, 1992.

HANSEN, H. P.; KISSELEVA, T.; KOBARG, J.; HORN-LOHRENS, O.; HAVSTEEN, B.; LEMKE H. A zinc metalloproteinase is responsible for the release of CD30 on human tumor cell lines. **Int. J. Cancer**, **63**:750-756, 1995.

HARRIS, N.L., FERRY, J.A., SWERDLOW, S.H. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Hematopathology Workshop. **Semin. Diagn. Pathol.**, **14**:8-14, 1997.

HARRIS, N. L. Hodgkin's disease: classification and differential diagnosis. **Mod. Pathol.**, **12**:159-176, 1999.

HARRIS, N. L., JAFFE, E. S.; STEIN, H.; BANKS, P. M.; CHAN, J. K.; CLEARY, M.L.; DELSOL, G.; DE WOLF-PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.C. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**, **84**:1361-1392, 1994.

HAYBITTLE, J. L.; HAYHOE, F. G. J.; EASTERLING, JELLIFFE, A. M.; BENNETT, M. H.; VAUGHAN HUDSON, G.; VAUGHAN HUDSON, B.; MACLENNAN, K. A. Review of British National Lymphoma Investigation studies of Hodgkin's disease and development of prognostic index. **Lancet**, **27**:967-972, 1985.

HENDERSON, S.; ROWE, M.; GREGORY, C.; CROOM-CARTER, D.; WANG, F.; LONGNECKER, R.; KIEFF, E.; RICKINSON, A. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. **Cell**, **65**:1107-15, 1991.

HERBST, H., RAFF, T., STEIN, H. Phenotypic modulation of Hodgkin and Reed-Sternberg cells by Epstein-Barr virus. **J. Pathol.**, **1**:54-59, 1996.

HOLMAN, C. D. J.; MATZ, L. R.; FINLAY-JONES, L. R.; WATERS, E. D.; BLACKWELL, J. B.; JOYCE, P. R.; KELSALL, G. R.; SHILKIN, K. B.; CULLITY, G. J.; WILLIAMS, K. E.; MATTHEWS, M. L.; ARMSTRONG, B. K. Inter-observer variation in the histopathological reporting of Hodgkin's disease: an analysis of diagnostic subcomponents using kappa statistics. **Histopathology**, **7**:399-407, 1983.

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

HU, E.; HUFFORD, S.; LUKES, R.; BERNSTEIN-SINGER, M.; SOBEL, G.; GILL, P.; PINTER-BROWN, L.; RARICK, M.; ROSEN, P.; BRYNES, R. Third - Word Hodgkin's disease at Los Angeles County-University of Southern California Medical Center. **J. Clin. Oncol.**, **6**:1285-1292, 1988.

INGHIRAMI, G.; MACRI, L.; ROSATI, S.; ZHU, B.Y.; YEE, H.T.; KNOWLES, D.M. The Reed-Sternberg Cells of Hodgkin Disease are Clonal **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **91**: 9842-9846, 1994.

JACKSON, H. J. R.; PARKER JUNIOR, F. **Hodgkin's disease and allied disorders**. New York: Oxford University Press, 1947.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; DIEBOLD, J.; MULLER-HERMELINK, HK. World Health Organization Classification of Lymphomas; a work in progress. **Ann. Oncol.**, **9**:S25-S30, 1998. Suppl. 5.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. Hodgkin lymphoma. In: \_\_\_\_\_ . **Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press, 2001. cap. 10, p. 237-254.

JONES, D.; O'HARA, C.; KRAUS, M. D.; PEREZ-ATAYDE, A. R.; SHAHSAFAEI, A.; WU, L.; DORFMAN, D. M. Expression panem of T-cell-associated chemokine receptors and their chemokines correlates with specific sub-types of T-cell non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, **96**:685-690, 2000.

JIWA, N.M.; KANAVAROS, P.; VAN DER VALK, P.; WALBOOMERS, J.M.; HORSTMAN, A.; VOS, W.; MULLINK, H.; MEIJER, C.J. Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. **J. Clin. Pathol.**, **46**:211-217, 1993.

KADIN, M. E.; AGNARSSON, B. A.; EILINGSWORTH, L.R.; NEWCOM, S. R. Immunohistochemical evidence of a role for transforming growth factor beta in the pathogenesis of nodular sclerosing Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, **136**:1209-1214, 1990.

KADIN, M.E.; GLATSTEIN, E.; DORFMAN, R.F. Clinicopathologic studies of 117 untreated patients subjected to laparotomy for the staging of Hodgkin's disease. **Cancer**. **27**(6):1277-1294, 1971.

KADIN, M. E.; LIEBOWITZ, D. N. **Cytokines and cytokine receptors in Hodgkin's disease**. In: MAUCG, P.; ARMITAGE, J. D.; DIEHL, V.(Ed.). Philadelphia: Lippincott Williamss & Wilkins, 1999. p. 139.

KADIN, M. I. The borderline between Hodgkin's lymphomas and anaplastic large cell lymphoma **Am. J. Surg. Pathol.**, **22**:133, 1998. (Abstract).

KAMEL, O. W.; GELB, A. B.; SHIBUYA, R. B.; WARNKE, R. A. Leu 7 (CD57) reactivity distinguishes nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease from nodular sclerosing Hodgkin's disease, T-cell-rich B-cell lymphoma and follicular lymphoma. **Am. J. Pathol.**, **142** :541-546, 1993.

KANEKO, Y.; FRIZZERA, G.; EDAMURA, S.; MASEKI, N.; SAKURAI, M.; KOMADA, Y.; SAKURAI, M.; TANAKA, H.; SASAKI, M.; SUCHI, T. A novel translocation, t(2;5)(p23;q35), in childhood phagocytic large T-cell lymphoma mimicking malignant histiocytosis. **Blood**, **73**:806-813, 1989.

KANZLER, H.; KUPPERS, R.; HANSMANN, M. L.; RAJEWSKY, K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant

tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. **J. Exp. Med.**, **184**:1495-1505, 1996.

KAPLAN, H. S. Hodgkin's disease: unfolding concepts concerning its nature, management and prognosis. **Cancer**, **45**:2439-2474, 1980.

KAPP, U.; YEH, W. C.; PATTERSON, B.; ELIA, A. J.; KAGI, D.; HO, A.; HESSEL, A.; TIPSWORD, M.; WILLIAMS, A.; MIRTOSOS, C.; ITIE, A.; MOYLE, M.; MAK, T.W. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **J. Exp. Med.**, **189**:1939-1946, 1999.

KEHRL, J.H., RIVA, A., WILSON, G.L., THEVENIN, C. Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression. **Immunol.Today**, **9**:432-436, 1994.

KELLER, A. R.; KAPLAN, H. S.; LUKES, R. J.; RAPPAPORT, H. Correlation of histopathology with other prognostic indicators in Hodgkin's disease. **Cancer**, **22**:487-499, 1968.

KENNEDY, B. J.; FREMGER, A. M.; MENCK, H. R. The National Cancer Data Base report on Hodgkin's disease for 1985-1989 and 1990-1994 **Cancer**, **83**:1041-1042, 1998.

KINNEY, M. C.; COLLINS, R. D.; GREER, J. P.; WHITLOCK, J. A.; SIOUTOS, N.; KADIN, M. E. A small-cell-predominant variant of primary Ki-1 (CD30)+ T-cell lymphoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, **17**:859-868, 1993.

KINNEY, M. C.; KADIN, M. E. The pathologic and clinical spectrum of anaplastic large cell lymphoma and correlation with ALK gene dysregulation. **Am. J. Clin. Pathol.**, **3** (Suppl. 1):S56-S67, 1999.

KHAN, G.; GUPTA, R.K.; COATES, P.J.; SLAVIN, G. Epstein-Barr virus infection and bcl-2 proto-oncogene expression. Separate events in the pathogenesis of Hodgkin's disease? **Am. J. Pathol.**, **143**:1270-1274, 1993.

KNECHT, H.; BACHMANN, E.; BROUSSET, P.; SANDVEJ, K.; NADAL, D.; BACHMANN, F.; ODERMATT, B.F.; DELSOL, G.; PALLESEN, G. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. **Blood**, **82**:2937-2942, 1993.

KRENACS, L.; WELLMANN, A.; SORBARA, L.; HIMMELMANN, A. W.; BAGDI, E.; JAFFE, E. S.; RAFFELD, M. Cytotoxic cell antigen expression in anaplastic large cell lymphomas of T- and null-cell type and Hodgkin's disease: evidence for distinct cellular origin. **Blood**, **89**:980-989, 1997.

KRENACS, L.; HIMMELMANN, A. W.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L.; FEST, T.; RIVA, A.; WELLMANN, A.; BAGDI, E.; KEHRL J. H.; JAFFE, E. S.; RAFFELD, M. Transcription Factor B-Cell-Specific Activator Protein (BSAP) Is Differentially Expressed in B Cells and in Subsets of B-Cell Lymphomas. **Blood**, **92**:1308-1316, 1998.

KUPPERS, R. Identifying the precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: role of the germinal center in B-cell lymphomagenesis. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **21**:4-9, 1999. Suppl. 1.

KÜPPERS, R., RAJEWSKY, K., ZHO, M., SIMONS, G., LAUMANN, R., FISCHER, R., HANSMANN, ML. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **91**:0962-10966, 1994.

LIU, Y.J.; MASON, D.Y.; JOHNSON, G.D.; ABBOT, S.; GREGORY, C.D.; HARDIE, D.L.; GORDON, J.; MACLENNAN, I.C. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. **Eur. J. Immunol.**, **21**:1905-1910., 1991.

LUKES, R. J. Criteria for involvement of lymph node, bone marrow, spleen, and liver in Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, **31**:1755-17672, 1971.

LUKES, R. I.; BUTLER, J. J.; HICKS, E. B. Natural history of Hodgkin's disease as relate I to its pathologic picture. **Cancer**, **19**:317-344, 1966.

LUKES, R. J.; BUTLER, J. J. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, **26**:1063-1081, 1966.

LUKES, R.J.; TINDLE, B.H.; PARKER, J.W. Reed-Sternberg-like cells in infectious mononucleosis. **Lancet**, **2**:1003-1004, 1969.

MACK, T.M., COZEN, W., SHIBATA, D.K., WEISS, L.M., NATHWANI, B,N, HERNANDEZ, A.M., TAYLOR, C.R., HAMILTON, A.S., DEAPEN, D.M., RAPPAPORT, E.B. Concordance for Hodgkin's disease in identical twins suggesting

genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. **N. Engl. J. Med.** **332**:413-418, 1995.

MACLENNAN, K. A.; BENNETT, M. H.; TU, A.; HUDSON, B. V.; EASTERLING, M. J.; HUDSON, G. V.; JELLIFFE, A. M. Relationship of histopathologic features to survival and relapse in nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 1659 patients. **Cancer**, **64**:1686-1693, 1989.

MANN, KP, HALL, B., KAMINO, H., BOROWITZ, MJ., RATECH, H. Neutrophil-rich, Ki-1-positive anaplastic large-cell malignant lymphoma. **Am.J.Surg.Pathol.**, **19**:407-416, 1995.

MASON, D. Y.; BANKS, P. M.; CHAN, J.; CLEARY, M. L.; DELSOL, G.; DE WOLF PEETERS, C.; FALINI, B.; GATTER, K.; GROGAN, T. M.; HARRIS, N. L. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease: a distinct clinicopathological entity. **Am. J. Surg. Pathol.**, **8** :526-530, 1994.

MARAFIOTI, T.; HUMMEL, M.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; FOSS, H. D.; FALINI, B.; DELSOL, G.; ISAACSON, P. G.; PILERI, S.; STEIN, H. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. **N. Eng. J. Med.**, **337**:435-458, 1997.

MARAFIOTI, T.; HUMMEL, M.; FOSS, H. D.; LAUMEN, H.; KORBJUHN, P.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; LAMMERT, H.; DEMEL, G.; THEIL, J.; WIRTH, T.; STEIN, H. Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. **Blood**, **95**:1443-50, 2000.

MASON, D. Y.; BASTARD, C.; RIMOKH, R.; DASTUGUE, N.; HURET, J. L.; KRISTOFFERSSON, U.; MAGAUD, J. P.; NEZELOF, C.; TILLY, H.; VANNIER, J. P. CD30-positive large cell lymphomas ('Ki-1 lymphoma') are associated with a chromosomal translocation involving 5q35. **Br. J. Haematol.**, **74**:161-168. 1990

MAX, E. E.; WAKATSUKI, Y.; NEURATH, M. F.; STROBER, W. The role of BSAP in immunoglobulin isotype switching and B-cell proliferation. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **194**:449-458, 1995.

MCBRIDE, J. A.; RODRIGUEZ, J.; LUTHRA, R.; ORDONEZ, N. G.; CABANILLAS, F.; PUGH, W. C.; T-Cell-rich B large cell lymphoma simulating lymphocyte-rich Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, **20**:193-201, 1996

MEDEIROS, L. J. GREINER TC Hodgkin's disease. **Cancer**, **75**:357-369, 1995.

MIETTINEN M, FRANSSILA KO, SAXEN E. Hodgkin's disease, lymphocytic predominance nodular: increased risk for subsequent non-Hodgkin'. **Cancer**, **5**:2293-2300, 1983.

MORRIS SW, KIRSTEIN MN, VALENTINE MB, DITTMER K, SHAPIRO DN, LOOK AT, SALTMAN DL. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. **Science**, **267**:316-317, 1995.

MÜSCHEN, M., RAJEWSKY, K., BRÄUNINGER, A., BAUR, A. S., OUDEJANS, J. J., ROERS, A., HANSMANN, M.-L., KÜPPERS, R. Rare Occurrence of Classical Hodgkin's Disease as a T Cell Lymphoma. **J. Exp. Med.**, **19**:387-394, 2000.

NADALI, G.; VINANTE, F.; STEIN, H.; TODESCHINI, G.; TECCHIO, C.; MOROSATO, L.; CHILOSI, M.; MENESTRINA, F.; KINNEY, M. C.; GREER, J. P. Serum levels of the soluble form of CD30 molecule as a tumor marker in CD30+ anaplastic large-cell lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, **13**:1355-1360, 1995.

NOWELL PC, FINAN JB, VONDERHEID EC. Clonal characteristics of cutaneous T cell lymphomas: cytogenetic evidence from blood, lymph nodes, and skin. **J. Invest. Dermatol.**, **78**:69-75, 1982.

OSHIMURA, M.; SANDBERG, A.A. Chromosomal 6q-anomaly in acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, **2**:1405-1406, 1976.

OUDEJANS, J. J, KUMMER, J. A.; JIWA, M.; VAN DER VALK, P.; OSSENKOPPELE, G. J.; KLUIN, P. M.; KLUIN-NELEMANS, J. C.; MEIJER, C. J. Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, **148**:233-240, 1996.

PALLESEN, G., HAMILTON-DUTOIT, S.J. Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. **Am. J. Pathol.**, **133**:446-450, 1988.

PALLESEN, G.; HAMILTON-DUTOIT, S.J.; ROWE, M.; YOUNG, L.S. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. **Lancet**, **337**:320-322, 1991.

PATCHEFSKY AS, BRODOVSKY H, SOUTHARD M, MENDUKE H, GRAY S, HOCH WS. Hodgkin's disease. A clinical and pathologic study of 235 cases. **Cancer**, **32**:150-161, 1973.

PEH, S.C., LOOI, L.M., PALLESEN, G. Epstein-Barr virus (EBV) and Hodgkin's disease in a multi-ethnic population in Malaysia. **Histopathology**, **30**:227-233, 1997.

PELICCI, P.G.; KNOWLES, D.M.; MAGRATH, I.; DALLA-FAVERA R. Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. **Proc. Nat.l Acad. Sci. USA.**, **83**:2984-1988, 1986.

PENNY, R. J.; BLAUSTEIN, J. C.; LONGTINE, J. A.; PINKUS, G. S. Ki-1-positive large cell lymphomas, a heterogenous group of neoplasms. Morphologic, immunophenotypic, genotypic, and clinical features of 24 cases. **Cancer**, **68**:362-373, 1991.

PFREUNDSCHUH, M.; MOMMERTZ, E.; MEISSNER, M.; FELLER, A. C.; HASSA, R.; KRUEGER, G. R.; DIEHL, V. Hodgkin and Reede Sternberg cell associated monoclonal antibodies HRS-1 and HRS-2 react with activated cells of lymphoid and monocytoid origine. **Anticancer Res.**, **8**:217-224, 1988.

PILERI, S.; FALINI, B.; DELSOL, G.; STEIN, H.; BAGLIONI, P.; POGGI, S.; MARTELLI, M. F.; RIVANO, M. T.; MASON, D. Y.; STANSFELD, A. G. Lymphohistiocytic T-cell lymphoma (anaplastic large cell lymphoma CD30+/Ki-1 + with a high content of reactive histiocytes). **Histopathology**, **16**:383-391, 1990.

PINKUS, G. S.; PINKUS, J. L.; LANGHOFF, E.; MATSUMURA, F.; YAMASHIRO, S.; MOSIALOS, G.; SAID, J. W. Fascin, a sensitive new marker for Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation? **Am. J. Pathol.**, **150**:543-562, 1997.

POPPEMA, S. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease. **Semin. Diag. Pathol.**, **9**:257-264, 1992.

POPPEMA, S.; KALETA, J.; HEPERLE, B. Chromosomal abnormalities in patients with Hodgkin's disease: evidence for frequent involvement of the 14q chromosomal region but infrequent bcl-2 gene rearrangement in Reed-Sternberg cells. **J. Natl. Cancer. Inst.**, **84**:1789-17937, 1992.

PÖTTER, R. Paediatric Hodgkin's disease. **Eur. J. Cancer**, **35**:1466-1474, 1999.

PULFORD, K.; LAMANT, L.; MORRIS, S. W.; BUTLER, L. H.; WOOD, K. M.; STROUD, D.; DELSOL, G.; MASON, D. Y. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. **Blood**, **89**:1394-1404, 1997.

RATHER, L. J. Who discovered pathognomonic giant cell of Hodgkin's disease? **Bull NY Acad. Med.**, **48**:943-950, 1972.

RAZZOUK, B.I., GAN, Y.J., MENDONCA, C., JENKINS, J.J., LIU, Q., HUDSON, M., SIXBEY, J.W., RIBEIRO, R.C. Epstein-Barr virus in pediatric Hodgkin disease: age and histotype are more predictive than geographic region. **Med. Pediatr. Oncol.**, **28**:248-54, 1997.

RIMOKH, R.; MAGAUD, J. P.; BERGER, F.; SAMARUT, J.; COIFFIER, B.; GERMAIN, D.; MASON, D. Y. A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ("Ki-1 lymphoma"). **Br. J. Haematol.**, **71**:31-36, 1989.

ROSENBERG, S. A.; CANELLOS, G. P. Hodgkin's Disease. In: CANNELOS, G.P. LISTER, T. A.; SKLAR, J.L. (Ed.). **The lymphomas**. Philadelphia: WB Saunders, 1998. p. 305-331.

RUDIGER, T.; OTT, G.; OTT, M.M.; MULLER-DEUBERT, SM.; MULLER-HERMELINK, HK. Differential diagnosis between classical Hodgkin's lymphoma. T-cell – rich B – cell lymphoma and paragranuloma by paraffin immunohistochemistry **Am. J. Surg. Pathol.**, **22**:1184-1194, 1998.

SAIDJ. W. The immunohistochemistry of Hodgkin's disease. **Semin. Diagn. Pathol.**, **8**:265-271, 1992.

SAMOSZUK, M.; NANSEN, L. Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. **Blood**, **75**:13-16, 1990.

SCHLAIFER, D.; MARCH, M.; KRAJEWSKI, S.; LAURENT, G.; PRIS, J.; DELSOL, G.; REED, J.C.; BROUSSET, P. High expression of the bcl-x gene in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **Blood**, **85**:2671-2674, 1995.

SCHWAB, U.; STEIN, H.; GERDES, J.; LEMKE, H.; KIRCHNER, H.; SCHAADT, M.; DIEHL, V. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. **Nature**, **299**:65-67, 1982.

SCHWARTING, R.; GERDES, J.; STEIN, H. BER-H2: a new monoclonal antibody of the Ki-1 family for detection of Hodgkin's disease in formaldehyde-fixed tissue sections. In: MC-MICHAELA; BEVERLY, P.; COBBOLD, S. (Eds.). **Leukocyte Typing III**. Oxford University Press, 1987.

SCHWARTING, R.; GERDES, J.; DURKOP, H.; FALINI, B.; PILERI, S.; STEIN, H. Ber-H2; a new anti-Ki-1 (CD30) monoclonal antibody directed at a formalin-resistant epitope. **Blood**, **74**:1678-1689, 1989.

SEIF, G.S.; SPRIGGS, A.I. Chromosome changes in Hodgkin's disease. **J. Natl. Cancer Inst.**, **39**:557-70, 1967.

SHAH, P. C.; BERTOLINO, E.; SINGH, H. Using altered specificity Oct-1 and Oct-2 mutants to analyze the regulation of immunoglobulin gene transcription. **EMBO J.**, **16**:7105-7117, 1997.

SIEBERT, J. D.; STUCKEY, J. H.; KURTIN, P. J.; BANKS, P. M. Extranodal lymphocyte predominance Hodgkin's disease: clinical and pathologic features. **Am. J. Clin. Pathol.**, **103**:485-491, 1995.

SINGH, M.; BIRSHTEN, B.K. NF-HB (BSAP) is a repressor of the murine immunoglobulin heavy-chain 3' alpha enhancer at early stages of B-cell differentiation. **Mol. Cell. Biol.**, **13**:3611-3622, 1993.

SKMNIDER, B. F.; ELIA, A. J.; GASCOYNE, R. D.; TRUMPER, L. H.; VON BONIN, F.; KAPP, U.; PATTERSON, B.; SNOW, B. E.; MAK, T. W. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. **Blood**, **97**:250-255, 2001.

SMYTH, M. J.; APANI, J. A. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. **Immunol. Today**, **16**, 202, 1995.

STEIN, H. Hodgkin's disease. **Am. J. Surg. Pathol.**, **21**:119-120, 1977. (Abstract).

STEIN, H. Diagnosis of Hodgkin's disease, Hodgkin's like anaplastic large cell lymphoma, and T cell/histiocyte-rich B cell lymphoma. In: MASON, D. Y.; HARRIS, N. L., (Eds.) **Human lymphoma: clinical implications of the real classification**. London: Springer, 1999, p. 520-524.

STEIN, H.; GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; MASON, D. Y.; ZIEGLER, A.; SCHIENLE, W.; DIEHL, V. Identification of Hodgkin and Sternberg-Reed cells as a unique cell type derived from a newly-detected small-cell population. **Int. J. Cancer**, **30**:445-459, 1982.

STEIN, H., MARAFIOTI, T., FOSS, H.-D., LAUMEN, H., HUMMEL, M., ANAGNOSTOPOULOS, I., WIRTH, T., DEMEL, G., FALINI, B. Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. **Blood**, **97**: 496-501, 2001.

STEIN, H.; MASON, D. Y.; GERDES, J.; O'CONNOR, N.; WAINSCOAT, J.; PALLESEN, G.; GATTER, K.; FALINI, B.; DELSOL, G.; LEMKE, H. The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. **Blood**, **66**:848-858, 1985.

STEIN, H.; UCHANSKA-ZIEGLER, B.; GERDES, J.; ZIEGLER, A.; WERNET, P. Hodgkin and Sternberg-Reed cells contain antigens specific to late cells of granulopoiesis. **Int. J. Cancer**, **29**:283-290, 1982.

STRONG, R.C.; KORSMEYER, S.J.; PARKIN, J.L.; ARTHUR, D.C.; KERSEY, J.H. Human acute leukemia cell line with the t(4;11) chromosomal rearrangement exhibits B lineage and monocytic characteristics. **Blood**, **65**:21-31, 1985.

STRUM, S.B.; PARK, J. K.; RAPPAPORT, H. Observation of cells resembling Sternberg-Reed cells conditions other than Hodgkin's disease. **Cancer**, **26**:176-190, 1970.

TAKEI, M., KANG, H., TOMURA, K., IKEDA, E., KARASAKI, M., NAKAUCHI, H., OKUMURA, K., MASAWADA, S. Expression of Leu M1 antigen on a monoclonal B cell line established from a patient with rheumatoid arthritis. **Immunol. Letters**, **23**: 43-48, 1990.

TERUYA-FELDSTEIN, J.; JAFFE, E. S.; BURD, P. R.; KINGMA, D. W.; SETSUDA, J. E.; TOSATO, G. Differential chemokine expression in tissues involved by

Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxm expression and tissue eosinophilia. **Blood**, **93**:2463-2470, 1999.

TILLY, H.; BASTARD, C.; DELASTRE, T.; DUVAL, C.; BIZET, M.; LENORMAND, B.; DAUCE, JP.; MONCONDUIT, M.; PIGUET, H. Cytogenetic studies in untreated Hodgkin's disease. **Blood**, **77**:1298-1304, 1991.

TINDLE, B. H.; PARKER, J. W.; LUKES, R. J. "Reed-Sternberg cells" in infectious mononucleosis? **Am. J. Clin. Pathol.**, **58**:607-617, 1972.

TRUMPER, L.H.; BRADY, G.; BAGG, A.; GRAY, D.; LOKE, S.L.; GRIESSER, H.; WAGMAN, R.; BRAZIEL, R.; GASCOYNE, R.D.; VICINI, S. Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. **Blood**, **81**:3097-3115, 1993.

TSUJIMOTO, Y.; FINGER, L.R.; YUNIS, J.; NOWELL, P.C.; CROCE, C.M. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. **Science**, **226**:1097-1099, 1984.

TZANKOV, A.; KRUGMANN, J.; FEND, F.; FISCHHOFER, M.; GREIL, R.; DIRNHOFER, S. Prognostic Significance of CD20 Expression in Classical Hodgkin Lymphoma: A Clinicopathological Study of 119 Cases. **Clin. Cancer Res.**, **9**:1381-1386, 2003.

VAN DEN, B. A.; VISSER, L.; POPPEMA, S. High expression of the CC chemo-kine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. **Am J Pathol.**, **154**:1685-1691, 1999.

VAUX, D.L.; CORY, S.; ADAMS, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**, **335**:440-442, 1988.

VON WASIELEWSKI R, SETH S, FRANKLIN J, et al. Prevalence, presentation and prognosis of lymphocyte-rich classic Hodgkin's disease. **Mod. Pathol.**, **12**:147, 1999. (Abstract).

WANG, D.; LIEBOWITZ, D.; KIEFF, E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. **Cell**. **43**:831-40, 1985.

WATERS, S. H.; SAIKH, K. U.; STAVNEZER, E. A B-cell-specific nuclearprotein that binds to DNA sites 58 to immunoglobulin Sa tandem repeats is regulated during differentiation. **J. Mol. Cell. Biol.**, **9**:5594, 1989.

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

XU, L.; KIM, M.G.; MARCU, K. B. Properties of B cell stage specific and ubiquitous nuclear factors binding to immunoglobulin heavy chain gene switch regions. **Int. Immunol.**, **4**:875, 1992.

ZINZANI, P. L.; PILERI, S.; BENDANDI, M.; BUZZI, M.; SABATTINI, E.; ASCANI, S.; GHERLINZONI, F.; MAGAGNOLI, M.; ALBERTINI, P.; TURA, S. Clinical implications of serum levels of soluble CD30 in 70 adult anaplasie large-cell lymphoma patients. **J. Clin. Oncol.**, **16**:1532-1537, 1998.

## 10 ANEXOS

### 10.1. ANEXO I

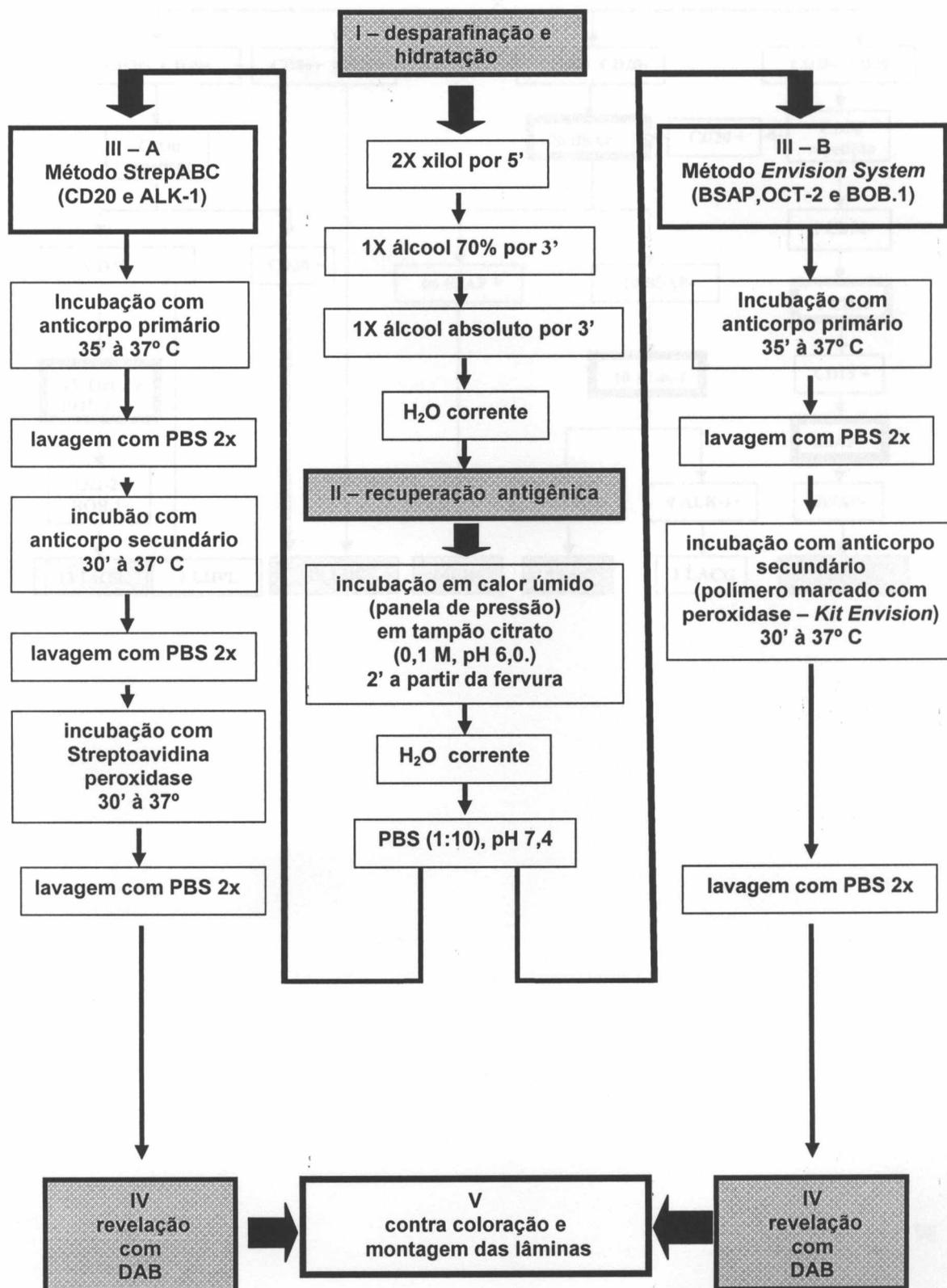
**Tabela 1 – Características dos casos: idade, sexo, diagnóstico por H&E, diagnóstico após a IHQ e resultados da imunoistoquímica. LNH: linfoma não Hodgkin; LACG: linfoma anaplásico de células grandes; LHNCL: linfoma de Hodgkin não classificado; LHPL: linfoma de Hodgkin predominância linfocítica; LHCRL: linfoma de Hodgkin clássico rico em linfócitos; LHNCL: linfoma de Hodgkin não classificado; LHDL: linfoma de Hodgkin depleção linfocítica; LHEN: linfoma de Hodgkin esclerose nodular e LHCM: linfoma de Hodgkin celularidade mista.**

N	CASO	IDADE	SEXO	DIAGNÓSTICO por H&E	DIAGNÓSTICO após IHQ	CD 30	CD 20	BSAP	ALK	Oct-2, BOB.1	CD 15
1	73/23	12	FEM	LHEN	LACG	+	-		+		
2	76/145	6	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
3	77/160	10	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
4	79/84	10	MAS	LHPL	LHCM	+	-	+			
5	79/167	5	MAS	LNH	LHCM	+	-	+			
6	80/227	7	MAS	LHPL	LHCM	+	-	+			
7	80/232	4	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
8	81/224	6	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
9	81/280	8	MAS	LHCM	LHCM	+	+				
10	81/293	10	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
11	81/355	4	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
12	82/39	7	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
13	82/46	7	MAS	LHEN	LHEN	+	+	+			
14	82/128	9	MAS	LHPL	LHPL	-	+	+		+	
15	82/199	6	MAS	LHCM	LHCM	+	+				
16	82/302	10	MAS	LHEN	LHEN	+	-	-	-		
17	82/531	7	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
18	83/103	6	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
19	83/391	9	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
20	83/409	13	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
21	84/59	3	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
22	84/118	3	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
23	84/378	3	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
24	84/461	14	MAS	LHCM	LHCM	+	+				
25	84/472	8	MAS	LHPL	LHPL	-	+			+	
26	84/501	8	FEM	LHEN	LHEN	+	-	-	-		
27	85/39	7	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
28	85/81	8	MAS	LHPL	LHCM	+	-	+			
29	85/126	5	FEM	LHCM	LHCM	+	+	+			
30	86/146	8	MAS	LHCM	LHDL	+	-				
31	86/200	6	MAS	LHDL	LHEN	+	+	+			
32	86/326	6	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
33	87/56	12	MAS	LHEN	LHCM	+	-	-	-		
34	87/166	12	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
35	87/234	4	MAS	LHCM	LHEN	+	-	-	-		
36	87/415	13	FEM	Sem consenso	LHCM	+	+				
37	88/26	4	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
38	88/59	6	MAS	LHPL	LHCM	+	-	+			
39	88/504	11	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
40	88/511	3	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
41	89/95	14	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
42	89/208	12	FEM	LHCM	LHCM	+	+				
43	89/229	9	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
44	89/268	11	MAS	LHPL	LHPL	-	+			+	
45	89/280	6	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
46	89/371	9	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			

10.1. ANEXO I (continuação)

N	CASO	IDADE	SEXO	DIAGNÓSTICO por H&E	DIAGNÓSTICO após IHQ O	CD 30	CD 20	BSAP	ALK	Oct-2, BOB.1	CD 15
47	90/231	12	MAS	LHDL	LHDL	+	+				
48	90/15	14	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
49	90/105	5	MAS	LHPL	LHPL	-	+	+		+	
50	90/121	7	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
51	90/124	10	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
52	90/315	9	MAS	LHCM	LHCM	+	-	-	-		
53	90/225	14	FEM	LHEN	LHEN	+	-	+			
54	90/402	6	MAS	LHDL	LHDL	+	-	+			
55	90/586	8	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
56	91/17	12	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
57	91/23	12	MAS	LHEN	LHEN	+	+				
58	91/318	6	FEM	LHEN	LHEN	+	-	+			
59	91/630	7	MAS	LHCM	LHCM	+	-	-	-		
60	92/88	12	MAS	LHEN	LHEN	+	+	+			
61	92/166	11	MAS	LHPL	LHPL	-	+			+	
62	92/478	4	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
63	92/573	8	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
64	93/88	13	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
65	93/150	11	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
66	93/304	4	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
67	93/341	9	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
68	93/390	7	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
69	93/393	4	MAS	LHPL	LHPL	-	+			+	
70	93/524	8	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
71	93/582	11	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
72	94/85	14	MAS	LHCM	LHPL	-	+			+	
73	94/86	6	MAS	LHPL	LHPL	-	+			+	
74	94/128	6	FEM	LHCM	LHNC	-	-	+			+
75	94/259	11	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
76	94/519	5	MAS	LHCM	LHCM	+	+				
77	94/700	8	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
78	94/701	13	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
79	95/191	6	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
80	95/380	14	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
81	96/32	8	MAS	Sem consenso	LHPL	-	+			+	
82	96/34	12	MAS	LHEN	LHEN	+	+				
83	96/204	5	MAS	LHPL	LHCM	+	+	-	-		
84	96/222	14	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
85	96/374	13	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
86	97/20	4	MAS	LHPL	LHPL	-	+			+	
87	98/129	9	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
88	98/298	7	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
89	98/426	12	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
90	98/482	13	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
91	98/519	10	FEM	LHPL	LHPL	-	+			+	
92	99/19	3	MAS	LHPL	LHPL	-	+			+	
93	99/389	6	MAS	LHDL	LHDL	+	-	+			
94	99/471	13	FEM	LHCM	LHCM	+	+				
95	99/531	10	MAS	LHCM	LHCM	+	+				
96	99/668	11	MAS	LHCM	LHCM	+	+				
97	00/433	10	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
98	01/150	10	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
99	01/711	13	FEM	LHCM	LHCM	+	-	+			
100	01/782	7	MAS	LHEN	LHEN	+	-	-	-		
101	02/317	13	FEM	LHEN	LHEN	+	-	+			
102	02/405	5	FEM	LHCM	LHCM	+	+				
103	02/546	11	MAS	Sem consenso	LHPL	-	+				
104	AM91/2125	10	MAS	LHCM	LHCM	+	-	-	-		
105	AM94/388	11	FEM	LHPL	LHPL	-	+			+	
106	AM96/492	12	MAS	LHCM	LHCM	+	-	+			
107	AM94/622	4	MAS	LHEN	LHEN	+	-	+			
108	AM97/705	10	MAS	Sem consenso	LHCM	+	-	+			
109	AM02/402	11	MAS	Sem consenso	LHCRL	+	-	-	-		

Figura 13 - Esquema da metodologia aplicada.



\*o anticorpo primário anti-BSAP foi incubado *overnigh*.

Figura 14 - Organograma da metodologia e painel de anticorpos empregados no estudo com o resultado da imunohistoquímica.

