

**A RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE SINTASES DO  
ÓXIDO NÍTRICO POR CÉLULAS DE  
REED-STERNBERG, APOPTOSE E INFECÇÃO PELO  
VÍRUS DE EPSTEIN-BARR NO LINFOMA DE  
HODGKIN**

**ANTÔNIO HUGO JOSÉ FRÓES MARQUES CAMPOS**

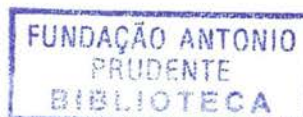
**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre em  
Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**

**São Paulo**

**2005**



## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Campos, Antônio Hugo José Fróes Marques

**A relação entre a expressão de sintases do óxido nítrico por células de Reed-Sternberg, apoptose e infecção pelo vírus de Epstein-Barr no linfoma de Hodgkin/** Antônio Hugo José Fróes Marques Campos-- São Paulo, 2005.

81p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. ÓXIDO NÍTRICO. 2. SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO. 3. CÉLULAS DE REED-STERNBERG. 4. APOPTOSE. 5. EBV. 6. DOENÇA DE HODGKIN/patologia.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Antônio Marques Campos** e **Leda Fróes Marques Campos**, e à minha irmã, **Anna Paula**, pelo carinho e apoio em todos os momentos.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, meu orientador, pela confiança em mim depositada, apoiando-me nos primeiros passos de minha carreira profissional.

A todos aqueles que fazem ou fizeram parte de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Corpo Docente da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, pelo talento em ensinar e pelo incentivo constante aos alunos da Pós-Graduação.

Aos membros da Banca de Qualificação, **Prof. Dr. José Vassalo**, **Dra. Maria Betânia Mahler Araújo** e **Prof. Dr. Luis Fernando Lopes**, pelas críticas e sugestões que em muito contribuíram para o andamento deste estudo.

À **Sra. Ana Maria Alves Kunikari**, Coordenadora da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, e **Sra. Márcia Miwa Hiratani**, funcionária da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, pela atenção com que sempre me receberam.

À **Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami**, colega de trabalho e amiga.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo, **Dr. Gilles Landman**, **Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto**, **Dra. Cynthia Aparecida Bueno de Osório** e **Dra. Isabela Werneck da Cunha**, pela compreensão e disponibilidade durante o Curso de Pós-Graduação.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo, em especial ao **Sr. José Ivanildo Neves**, **Sr. Severino da Silva**



**Ferreira, Sr. César Eugênio Nascimento Braga e Sra. Osiris Pereira Santos**, pela competência ao me auxiliarem durante a execução deste estudo.

À funcionária do Centro de Pesquisas do Instituto Ludwig, **Sra. Sueli Nonogaki**, pela ótima qualidade das reações imunoistoquímicas.

Aos residentes do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A C Camargo, por compreenderem minha ansiedade e ocasional falta de tempo neste período.

À **Sra. Alexandra Cardoso Longo**, pela dedicação e companheirismo.

À **Sra. Hirde Contesini**, Responsável pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital do Câncer A C Camargo, e demais funcionários, pela ajuda na seleção dos prontuários.

Às funcionárias da Biblioteca, em especial a **Sra. Suely Francisco**, pelo auxílio na revisão bibliográfica e formatação deste estudo.

À **Dra. Karina de Cássia Braga Ribeiro**, pela orientação na análise estatística deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo suporte financeiro, na modalidade auxílio à pesquisa, concedido para a execução deste trabalho.

## RESUMO

Campos AHJFM. **A relação entre a expressão de sintases do óxido nítrico por células de Reed-Sternberg, apoptose e infecção pelo vírus de Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Introdução.** O linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia caracterizada por uma minoria de elementos neoplásicos, chamados de células de Reed-Sternberg (CRS) e suas variantes, e uma mistura de células inflamatórias que infiltram a massa tumoral, incluindo linfócitos, eosinófilos, plasmócitos, histiócitos e fibroblastos. Estudos clínicos e biológicos nos últimos 20 anos demonstraram o LH é verdadeiramente um linfoma, constituído por duas entidades distintas: o LH forma predominância linfocitária nodular (LHPLN) e o LH Clássico (LHC). Além disso, forneceram evidências de que as CRS são derivadas de células B do centro germinativo que sofreram mutações defeituosas (“crippling” mutations) de seus genes de imunoglobulina, tornando-os não funcionais. Ao contrário de linfócitos normais, que entram em apoptose por não produzirem imunoglobulina ou por produzir imunoglobulinas com baixa afinidade antigênica, as CRS, por mecanismos ainda não completamente elucidados, são capazes de escapar deste processo de morte celular programada. Diversos genes ligados à regulação da apoptose, como os genes da família bcl-2, fas, fasL, c-FLIP, NFkappaB, têm sido investigados no LH, alguns dos quais parecem ter influência na evolução clínica dos pacientes. O papel desempenhado pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) no bloqueio da apoptose no LH também tem sido intensamente estudado. O óxido nítrico (ON) é uma molécula diatômica cuja participação na regulação de numerosos processos que governam a carcinogênese, como o estímulo à proliferação, ocorrência de mutações, bloqueio de apoptose, indução da angiogênese e ocorrência de metástases, tem sido intensamente estudada. O ON é produzido por uma família de enzimas denominadas sintases do óxido nítrico (NOS). Um aumento da expressão dos genes que codificam NOS e da



produção de ON tem sido demonstrado em diversas neoplasias humanas, incluindo cânceres de mama, estômago, cólon, bexiga, próstata, pulmão e neoplasias hematopoiéticas. **Objetivos.** O objetivo deste estudo é analisar a expressão das sintases do óxido nítrico (NOS1, NOS2), da nitrotirosina (evidência indireta da produção de óxido nítrico) e de proteínas associadas a apoptose (bcl-2, bax, p53, fas e fasL) no LHC, para testar a hipótese de que a produção de NOS e ON pelas CRS está envolvida na regulação defeituosa da apoptose nesta neoplasia. Foi estudada ainda a possível correlação destas moléculas com a infecção pelo EBV observada no LHC. Finalmente, pesquisou-se a capacidade das células L&H do LHPLN de produzir NOS e ON. **Material e métodos.** Blocos de parafina contendo material conservado em formalina de 238 casos de LHC foram selecionados do arquivo do Departamento de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1980 a 2000. Foram excluídos casos com material insuficiente para realização do estudo, biópsias de recidiva e casos HIV-positivos. Após revisão histopatológica e, quando necessário, imunoistoquímica, foram submetidos a estudo imunoistoquímico utilizando anticorpos para NOS1, NOS2, nitrotirosina, bcl-2, bax, p53, fas, fasL e LMP1. Foi realizada ainda hibridização in situ com sonda contra o transcrito EBER-1 do vírus de Epstein-Barr. As lâminas foram analisadas e os resultados submetidos à análise estatística. Foram selecionados ainda 7 casos de LHPLN, que, após confirmação diagnóstica, foram submetidos a estudo imunoistoquímico utilizando anticorpos para NOS1, NOS2 e nitrotirosina. **Resultados.** Dos 238 casos iniciais de LHC, 171 foram selecionados para análise. A expressão de NOS1 e de NOS2 foi observada em 42.1% e 55% dos casos, respectivamente. A expressão de nitrotirosina foi observada em 18.7% dos casos. As expressões de bcl-2, bax, p53, fas, fasL e LMP1 foram observadas, respectivamente, em 35.1%, 44.4%, 44.4%, 93,6%, 5.8% e 49.7% dos casos. O transcrito EBER-1 foi detectado em 46.8% dos casos. Foram observadas associações estatisticamente significativas entre fas e sexo masculino ( $p=0.032$ ), EBV (LMP-1 e EBER) e sexo masculino ( $p<0.0001$ ), EBV (LMP-1 e EBER) e subtipo histológico celularidade mista ( $p<0.0001$ ), EBV e estadios avançados (LMP-1,  $p=0.0459$ ; EBER,  $p=0.011$ ), EBV (EBER) e sintomas B ( $p=0.0481$ ), bax e p53 ( $p=0.036$ ), bax e fasL ( $p=0.046$ ), NOS1 e p53 ( $p=0.006$ ), bax e NOS2 ( $p=0.022$ ); e

entre bcl-2 e NOS2 ( $p=0.034$ ). Correlação inversa foi observada entre EBV (LMP-1) e NOS2 ( $p=0.018$ ), e entre EBV e bcl-2 (LMP-1,  $p=0.002$ ; EBER,  $p=0.006$ ). Observou-se ainda uma diminuição da sobrevida global associada à forte expressão de NOS2 ( $p=0.0098$ ). A forte expressão de NOS2 pelas CRS também foi fator associado a um pior prognóstico em casos tratados com o esquema quimioterápico MOPP/ABVD ( $p=0.0003$ ). Com relação ao LHPLN, observou-se expressão de NOS1 e NOS2 pelas células L&H em 42.9% e 71.4% dos casos, respectivamente. Não se observou a expressão de nitrotirosina. **Conclusões.** Os resultados do presente estudo demonstraram a capacidade das CRS de expressarem NOS e produzirem ON, assim como de expressarem genes produtores de proteínas reguladoras do ciclo celular. As correlações observadas entre NOS e as proteínas associadas a apoptose sugerem o envolvimento das NOS e do ON no controle deste processo. Observou-se ainda que a expressão de NOS2 está associada a uma menor sobrevida global nos casos de LHC. Com relação ao LHPLN, demonstrou-se que as células L&H são capazes de produzir NOS1 e NOS2. Não foi possível demonstrar, entretanto, a produção de nitrotirosina.



## SUMMARY

Campos AHJFM. [The relationship between nitric oxide synthases expression in classical Hodgkin lymphoma, apoptosis-related proteins and Epstein-Barr virus expression]. São Paulo; 2005. [Tese de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

**Background.** Hodgkin's lymphoma (HL) is a neoplasm composed by a minority of neoplastic cells, named Hodgkin and Reed-Sternberg (H-RS) cells, set in an inflammatory background consisting of lymphocytes, eosinophils, neutrophils, histiocytes, plasma cells and fibroblasts. Clinical and biological studies over the past 20 years have concluded that HL is indeed a lymphoma, divided into 2 distinct entities: Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL) and classical Hodgkin lymphoma (CHL). Furthermore, they gave evidence that H-RS cells are derived from germinal center B cells with rearranged immunoglobulin genes bearing crippling mutations. Unlike normal B lymphocytes, which suffer apoptosis when failing to produce immunoglobulins, or producing low-antigenic affinity immunoglobulins, H-RS cells, by mechanisms not fully understood, are capable of escaping apoptotic cell death. Many apoptotic regulators, such as bcl-2 family members, fas, fasL, c-FLIP, and NFkappaB, have been investigated in HL, some of which appearing to influence the clinical outcome of HL patients. The role of EBV in the resistance to apoptotic cell death of H-RS cells has also been under study. Nitric oxide (NO) is a diatomic molecule involved in multiple steps of carcinogenesis, such as DNA mutations, proliferation, blockage of apoptosis and angiogenic stimulation. NO is produced by a family of enzymes known as the nitric oxide synthases (NOS). NOS gene overexpression and NO production have been observed in many human tumors from various sites such as the breast, stomach, colon, bladder, prostate, lung and the haematopoietic system. **Objective.** The purpose of this study was to analyze the role of NOS (NOS1, NOS2) and apoptosis-associated proteins expression in HL, to test the hypothesis that NOS and NO production by H-RS cells are involved in the defective apoptotic program of this neoplasm. We also investigated the role of EBV

expression in HL on NOS expression and NO production. Finally, we investigated if L&H cells of NLPHL could produce NOS and NO. **Material and methods.** 238 retrospective cases of HL, diagnosed between 1980 and 2000, were retrieved from the archives of the Departamento de Patologia do Centro de Pesquisa do Hospital do Câncer A C Camargo. Cases without enough formalin-fixed and paraffin-embedded tissue to run the immunohistochemical (IHC) reactions, relapse biopsies and HIV-associated HL were excluded. Histological diagnosis was revised, with the use of immunostains when necessary. Immunostains with antibodies against NOS1, NOS2, nitrotyrosine, bcl-2, bax, p53, fas, fasL and LMP1 were performed. Cases were also tested for EBV presence using in situ hybridization for EBV early RNAs (EBER). We also selected 7 cases diagnosed as NLPHL, which were tested for NOS1, NOS2 and nitrotyrosine expression. **Results.** A total of 171 cases from the original 238 cases collected were available for analysis. NOS1 and NOS 2 expression were detected in 42.1% and 55% of the cases, respectively. Nitrotyrosine expression was observed in 18.7% of the cases. Bcl-2, bax, p53, fas, fasL and LMP1 expression were observed in 35.1%, 44.4%, 44.4%, 93,6%, 5.8% e 49.7% of the cases, respectively. The EBER-1 transcript was detected in 46.8% of the cases. Significant associations were established between fas and male gender ( $p=0.032$ ), EBV (LMP-1 e EBER) and male gender ( $p<0.0001$ ), EBV (LMP-1 e EBER) and mixed cellularity subtype ( $p<0.0001$ ), EBV and late stages of the disease (LMP-1,  $p=0.0459$ ; EBER,  $p=0.011$ ), EBV (EBER) and B symptoms ( $p=0.0481$ ), bax and p53 ( $p=0.036$ ), bax and fasL ( $p=0.046$ ), NOS1 and p53 ( $p=0.006$ ), bax and NOS2 ( $p=0.022$ ); and between bcl-2 e NOS2 ( $p=0.034$ ). An inverse correlation was observed between EBV (LMP-1) and NOS2 ( $p=0.018$ ), and between EBV and bcl-2 (LMP-1,  $p=0.002$ ; EBER,  $p=0.006$ ). Strong NOS2 expression was associated with a shorter overall survival ( $p=0.0098$ ). It also predicted a poor prognosis in those cases treated with MOPP/ABVD ( $p=0.0003$ ). Regarding NLPHL, NOS1 and NOS2 expression by L&H cells was detected in 42.9% and 71.4% of the cases, respectively. Nitrotyrosine expression was not detected. **Conclusions.** We conclude that H-RS cells are capable of expressing NOS and producing NO. They are also capable of producing many apoptosis-associated proteins. The correlations observed between NOS and apoptosis-associated proteins suggest that NOS and NO are involved in the defective apoptotic



program of HL. Strong NOS2 expression is associated with a poor outcome in HL. We also conclude that L&H cells of NLPHL express NOS1 and NOS2. Nitrotyrosine expression, however, could not be established.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Correlações entre pares de marcadores em 171 casos de LHC	40
<b>Figura 2</b>	LHC: (A) H&E; (B) CD30+, CD15+	41
<b>Figura 3</b>	LHC: (A) NOS1+; (B) NOS2+	42
<b>Figura 4</b>	LHC: (A) Nitrotirosina+; (B) bcl-2+	43
<b>Figura 5</b>	LHC: (A) bax+; (B) p53+	44
<b>Figura 6</b>	LHC: (A) fas+; (B) fasL+	45
<b>Figura 7</b>	LHC: (A) LMP-1+; (B) EBER+	46
<b>Figura 8</b>	LHPLN: (A) H&E; (B) CD20+	47
<b>Figura 9</b>	LHPLN: (A) NOS1+; (B) NOS2+	48
<b>Figura 10</b>	Curva atuarial de sobrevida global segundo a expressão de iNOS em pacientes portadores de LHC	49
<b>Figura 11</b>	Curva atuarial de sobrevida global segundo a expressão de iNOS em pacientes portadores de LHC tratados com MOPP/ABVD	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Anticorpos utilizados, com referências ao clone, fabricante, diluição, método de recuperação antigênica, controles positivos e critério de positividade	25
<b>Tabela 2</b>	Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com a intensidade	26
<b>Tabela 3</b>	Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com o número de células coradas	26
<b>Tabela 4</b>	Aspectos clínico-patológicos de 171 casos de LHC	36
<b>Tabela 5</b>	Resultado geral dos marcadores em 171 casos de LHC	37
<b>Tabela 6</b>	Correlação entre antígenos pesquisados e características clínico-patológicas em 171 casos de LHC	38
<b>Tabela 7</b>	Expressão imunoistoquímica das NOS e de nitrotirosina em 7 casos de LHPLN	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

CRS	Célula de Reed-Sternberg
DH	Doença de Hodgkin
EBV	Vírus de Epstein-Barr (do inglês Epstein-Barr Virus)
H&E	Hematoxilina-eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês Human Immunodeficiency Virus)
IHQ	Imunoistoquímica (do inglês Immunohistochemistry)
ISH	Hibridização <i>in situ</i> (do inglês <i>In Situ</i> Hybridization)
LH	Linfoma de Hodgkin
LHC	Linfoma de Hodgkin Clássico
LHCM	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Celularidade Mista
LHDL	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Depleção Linfocitária
LHEN	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Esclerose Nodular
LHPLN	Linfoma de Hodgkin Predomínio Linfocitário Nodular
LHRL	Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Rico em Linfócitos
NOS	Sintases do óxido nítrico (do inglês Nitric Oxide Synthases)
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde/World Health Organization
ON	Óxido nítrico
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês Vascular Endothelial Growth Factor)

## LISTA DE SÍMBOLOS

p valor estatístico de “p”

< menor que

= igual a

% porcentagem

$\chi^2$  teste do qui-quadrado

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Histórico	1
1.2	Origem da célula neoplásica	4
1.2.1	Célula de Reed-Sternberg e suas variantes mononucleares	4
1.2.2	Célula L&H	6
1.3	Classificação histológica, aspectos epidemiológicos e clínicos	7
1.3.1	Linfoma de Hodgkin Clássico	7
1.3.2	Linfoma de Hodgkin Predomínio Linfocitário Nodular	11
1.4	Vírus de Epstein-Baar	12
1.5	Apoptose	14
1.5.1	Papel na fisiologia normal	15
1.5.2	Papel na tumorigênese	16
1.6	Óxido nítrico e seu papel na biologia tumoral	17
1.6.1	Óxido nítrico e suas sintases	17
1.6.2	Papel do óxido nítrico e suas sintases nas neoplasias malignas	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
3.1	Casuística	21
3.2	Estudo imunoistoquímico	22
3.3	Análise estatística	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
4.1	Linfoma de Hodgkin Clássico	30
4.1.1	Caracterização da amostra e correlação entre parâmetros clínicos	30
4.1.2	Resultados por antígenos pesquisados	31
4.1.3	Correlação entre os antígenos e características clínico-morfológicas	32

4.1.4	Correlação entre os marcadores de apoptose	33
4.1.5	Correlação entre os marcadores de apoptose e EBV	33
4.1.6	Correlação entre os marcadores e a expressão de NOS	33
4.1.7	Análise da sobrevida global em relação aos antígenos pesquisados	34
4.2	Linfoma de Hodgkin Predomínio Linfocitário Nodular	35
4.2.1	Caracterização da amostra	35
4.2.2	Análise dos resultados por antígenos pesquisados	35
<b>5</b>	<b>FIGURAS RESULTADOS</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
6.1	Linfoma de Hodgkin Clássico	50
6.2	Linfoma de Hodgkin Predomínio Linfocitário Nodular	60
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>

## **ANEXO**

**Anexo 1** Formulário de coleta de dados



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO

Thomas Hodgkin é o responsável pela primeira descrição de um linfoma humano, feita em 1832 a partir do estudo de sete pacientes que apresentavam aumento de linfonodos e baço (HODGKIN 1832). O nome “Doença de Hodgkin” (DH) foi utilizado pela primeira vez por WILKS (1865). Entretanto, foi a partir das descrições microscópicas realizadas por STERNBERG (1898) e REED (1902), que a célula gigante singular presente em tais casos ganhou importância, sendo mais tarde conhecida por célula de Reed-Sternberg (CRS) e reconhecida como a característica morfológica patognomônica da DH.

Os trabalhos de Sternberg e Reed forneceram a primeira definição histopatológica da doença: a presença de CRS em um ambiente celular apropriado. Esta morfologia característica permitiu a separação dos casos de doença de Hodgkin de outras doenças inflamatórias ou neoplásicas que pudessem simulá-la clinicamente, fornecendo a base para o diagnóstico da DH pela maior parte do último século (WARNKE et al. 1995). De acordo com esta definição, o diagnóstico de DH é permitido quando se observa uma CRS diagnóstica (ou seja, uma célula gigante com dois ou mais lobos nucleares, cada qual contendo um nucléolo eosinofílico proeminente do tamanho aproximado de um linfócito pequeno) em um meio inflamatório heterogêneo constituído por linfócitos, macrófagos, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos. Variantes mononucleares da CRS, conhecidas como

Células de Hodgkin podem também estar presentes. A importância capital do diagnóstico morfológico da doença foi expressa na Classificação de Rye (LUKES & BUTLER 1966), que, com as categorias *predomínio linfocitário*, *celularidade mista*, *esclerose nodular* e *depleção linfocitária*, estabeleceu os princípios do diagnóstico e classificação da DH por mais de 30 anos.

A possibilidade de se estudar o perfil imunofenotípico das CRS por meio de imunoistoquímica, na década de 1980, levou ao achado de que estas células caracteristicamente expressavam os marcadores CD30 e CD15 (em um padrão típico de membrana e na região do complexo de Golgi) (WARNKE et al. 1995). A expressão *combinada* destes antígenos não foi observada em outras neoplasias, embora a expressão isolada de CD30 tivesse sido observada em linfócitos B e T ativados, macrófagos, linfomas não-Hodgkin e neoplasias não-linfóides como carcinomas e melanoma a expressão de CD15 foi observada em linfócitos T ativados, adenocarcinomas e células mielóides (WARNKE et al. 1995; HARRIS et al. 1994). Além disso, não se observou expressão de outros marcadores usualmente associados com Linfomas não-Hodgkin, como o antígeno leucocitário comum (CD45/LCA), antígenos de células B (CD20; CD79) e antígenos de células T (CD3; CD45RO). A combinação do diagnóstico morfológico já conhecido ao perfil imunoistoquímico característico das CRS foi adotada pela Classificação REAL, em 1994 (HARRIS et al.) e, posteriormente, pela Classificação de Tumores dos Tecidos Linfóide e Hematopoiético da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2001 (JAFFE et al. 2001).

Entretanto, o uso da imunoistoquímica no diagnóstico da DH tornou patente que sua definição morfológica abrigava várias entidades nas quais as “CRS”

identificadas eram negativas para CD30 e/ou CD15. Em particular, a categoria *predomínio linfocitário* provou abrigar 2 entidades: a hoje conhecida como tipo *rico em linfócitos* do Linfoma de Hodgkin Clássico (LHC) e outra entidade na qual as CRS peculiares eram CD30/CD15 negativas e CD45 e CD20 positivas, aproximando-a, portanto mais dos linfomas não-Hodgkin que dos outros subtipos da DH; esta última entidade é conhecida hoje como *Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocitária Nodular* (LHPLN) (MASON et al. 1994). Casos anteriormente diagnosticados como DH foram reclassificados como linfomas não-Hodgkin, principalmente dos tipos *grandes células B do mediastino*, *grandes células B rico em células T*, *anaplásico de grandes células* e *células T pleomórfico* (KINNEY et al. 1991; KANT et al. 1986; BRAZIEL e OYAMA 1997).

Com base em estudos que demonstraram serem a CRS e suas variantes, células neoplásicas derivadas de células linfóides (mais comumente do tipo B), o termo Linfoma de Hodgkin (LH) vem substituindo a denominação DH, sendo utilizado nas Classificações REAL e da OMS (ver item 1.2).

Hoje em dia, mais de 75% dos pacientes diagnosticados com LH serão curados com radioterapia e quimioterapia, isoladas ou em conjunto, seja em tratamento inicial ou de resgate (MAUCH et al. 1995). Nos casos de doença diagnosticada em estadios precoces, o prognóstico é excelente, com um índice de sobrevida livre de doença próximo de 100% (DIEHL et al. 2004). Mesmo em estadios avançados, o índice permanece relativamente elevado. Entretanto, naqueles 10 a 15% dos pacientes que recidivam após tratamento inicial, apenas metade vai entrar em uma 2ª remissão. O prognóstico também é ruim para pacientes que não respondem à quimioterapia de resgate ou apresentam nova recidiva após a 2ª



remissão. Além disso, a longo prazo, aumentam os riscos de desenvolvimento de uma 2ª neoplasia ou de aparecimento de sequelas relacionadas ao tratamento, como alteração do crescimento somático, infertilidade ou doença pulmonar restritiva (QUON e GLIEDMAN 2002).

Portanto, um melhor entendimento da biologia da célula tumoral pode levar ao desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas que aumentem o intervalo livre de doença em pacientes refratários ou com recidiva, e que apresentem menor índice de complicações relacionadas a longo prazo.

## **1.2 ORIGEM DA CÉLULA NEOPLÁSICA**

### **1.2.1 Célula de Reed-Sternberg e suas Variantes Mononucleares**

A origem e clonalidade das CRS foi motivo de debate por muitos anos. Embora fosse suspeitada por longo tempo sua origem linfóide a partir de uma célula B ou T, uma vez que já fora observado que linfócitos ativados poderiam apresentar imunoexpressão de CD30 e CD15, e que antígenos de células B ou T podiam ser demonstrados por CRS em alguns casos, não havia prova convincente desta suspeita (WOLF e DIEHL 1994). Entretanto, na década de 90, numerosos estudos utilizando CRS isoladas por micromanipulação e submetidas à reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de rearranjos nos genes da cadeia pesada de imunoglobulina elucidaram a origem das CRS a partir de uma célula B (KUPPERS et al. 1994; HUMMEL et al. 1995; KANZLER et al. 1996a e b; DELABIE et al. 1996; VOCKERODT et al. 1998; MARAFIOTI et al. 2000). Além disso, forneceram evidências de que as CRS são derivadas de células B do centro germinativo que

sofreram mutações defeituosas (“crippling” mutations) de seus genes de imunoglobulina, tornando-os não funcionais (KANZLER et al. 1996b).

Durante o desenvolvimento de uma célula B normal, linfócitos B não-estimulados (“naive B lymphocytes”), ou seja, que contém nenhuma mutação ou poucas mutações em seus genes de imunoglobulina entram no centro germinativo, onde, após exposição a antígenos, passam a apresentar altas taxas de mutação nas regiões variáveis dos genes de imunoglobulina (KLEIN et al. 1998; KUPPERS 1999). Este processo, chamado hipermutação somática, tem papel-chave ao gerar uma ampla diversidade de anticorpos e serve para aumentar a probabilidade de que um anticorpo de alta afinidade seja produzido contra um antígeno externo (KLEIN et al. 1998). Células B produtoras de anticorpos com alta afinidade para o antígeno apresentado deixam o centro germinativo para se tornar células B de memória ou plasmócitos. Células B não produtoras de anticorpo ou produtoras de anticorpos com baixa ou nenhuma afinidade ao antígeno apresentado entram em apoptose e morrem. De fato, a entrada da célula B no centro germinativo parece ativar um programa de morte celular, e as células são “resgatadas” deste programa de apoptose apenas se produzirem anticorpos de alta afinidade ao antígeno em questão. Este resgate parece envolver a ativação do gene *bcl-2*. Estudos evidenciaram que as CRS apresentam hipermutações dos genes de imunoglobulina, indicando que foram expostas ao ambiente do centro germinativo. Entretanto, em uma alta proporção dos casos estudados, os genes da cadeia pesada de imunoglobulina parecem ter sofrido mutações defeituosas (“crippling” mutations), como por exemplo, a criação de um “stop codon” no meio do gene, que faria com que fosse impossível para estas células produzir imunoglobulina (KUPPERS et al. 1994; KANZLER et al. 1996a e b;

KLEIN et al. 1998). Em apoio a estes achados, outro estudo demonstrou que o RNA mensageiro (mRNA) da cadeia pesada de imunoglobulina não pode ser detectado em CRS (VON WASIELEWSKI et al. 1996). Mutações estruturais do gene ou defeitos funcionais nos elementos reguladores do gene de imunoglobulina poderiam ser responsáveis pela perda da produção de mRNA (MARAFIOTI et al. 2000). Não é bem conhecido o modo como células B incapazes de produzir imunoglobulina poderiam escapar do processo de apoptose e a elucidação deste mecanismo pode acrescentar dados importantes para a compreensão da patogênese do LH.

### **1.2.2 Célula L&H**

Estudos similares do gene que codifica a cadeia pesada de imunoglobulina por PCR realizados em casos de LHPLN levaram à conclusão de que também as células L&H contém rearranjos clonais do gene de imunoglobulina (KUPPERS et al. 1994; MARAFIOTI et al. 1997; OHNO et al. 1997), confirmando a suspeita de que o LHPLN é uma neoplasia derivada de células B. Como no LHC, os genes de cadeia pesada de imunoglobulina no LHPLN mostram evidências de hipermutação somática, que parece ocorrer continuamente durante a vida destas células (“ongoing mutations”), ou seja, há aparente aquisição de mutações adicionais em altas taxas em gerações subsequentes de células tumorais, levando ao desenvolvimento de subclones do tumor (BRAEUNINGER et al. 1997; MARAFIOTI et al. 1997). Entretanto, ao contrário do que ocorre no LHC, estes rearranjos parecem produtivos (inexistência de mutações defeituosas); de fato, mRNA de cadeia pesada de imunoglobulina e mesmo imunoglobulina de superfície tem sido detectado na



maioria dos casos de LHPLN em alguns estudos (SCHMID et al. 1991; STOLER et al. 1995; VON WASIELEWSKI et al. 1996).

Em outros casos, estas mutações não estão presentes e o que ocorre são defeitos na transcrição do gene, especialmente nos fatores de transcrição Oct1/Oct2 e seus co-ativadores BOB.1/OBF.1 (CHANG et al. 1999; STEIN et al. 2001). Os fatores Oct1 ou Oct2 reconhecem a região promotora do gene de imunoglobulina e ativam a transcrição quando BOB1 também está presente no complexo (SHAN et al. 1997). Foi recentemente demonstrado que, em nível transcricional e translacional, as CRS do LHPLN expressam Oct2 e BOB.1, enquanto que as CRS do LHC apenas raramente expressam Oct2 ou BOB.1, mas nunca a combinação de ambos, essencial para a transcrição do gene de imunoglobulina (BARGOU et al. 1996; RE et al. 2001).

### **1.3 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS**

Os aspectos histopatológico, epidemiológico e clínico do LH já foram extensamente descritos em livros-texto (BURKE 2001; JAFFE et al. 2001). A nova classificação de Linfoma de Hodgkin da OMS reflete os resultados de estudos clínicos e biológicos realizados nos últimos 20 anos, que mostraram ser esta neoplasia constituída por duas entidades distintas: LHC e o LHPLN. Em verdade, a moderna classificação de LH é baseada no esquema proposto por LUKES & BUTLER (1966).



### 1.3.1 Linfoma de Hodgkin Clássico (LHC)

O LHC responde pela maioria dos casos de LH (95%) e tem uma distribuição etária caracteristicamente bimodal, com um pico de incidência entre a 1ª e 3ª décadas de vida e um segundo pico após a 5ª década. Há envolvimento preferencial de linfonodos cervicais (75% dos casos), sendo raro o acometimento de linfonodos não-axiais. Envolvimento primário extra-nodal é raro. Comprometimento de baço e medula óssea não é infrequente. Aproximadamente 55% dos pacientes têm doença localizada ao diagnóstico (estádios I e II). Os sintomas B (febre, sudorese noturna e perda de peso) estão presentes em aproximadamente 40% dos casos.

A subclassificação do LHC é baseada nas características do infiltrado inflamatório e na morfologia das CRS, identificando-se quatro subtipos histológicos:

O **Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Esclerose Nodular (LHEN)** responde por aproximadamente 70% dos casos de LHC, acomete preferencialmente adultos jovens e é o subtipo no qual não se observa predomínio do sexo masculino (aproximadamente 1:1). Há envolvimento preferencial do mediastino (80%), sendo infrequente o acometimento do baço (10%) e medula óssea (3%).

Morfologicamente, caracteriza-se pela presença de CRS que possuem núcleos polilobados, com lobos menores e nucléolos menos proeminentes que os de CRS encontradas em outros subtipos de LHC. A aparência à microscopia de que este tipo de CRS parece estar situado em lacunas é devida a artefato de fixação que provoca retração da membrana citoplasmática, e tornou-o conhecido como *célula lacunar*. As células lacunares estão dispostas em meio a um infiltrado inflamatório polimórfico, em um padrão de profileração nodular, ao qual associa-se um processo fibrosante

sexo masculino (70% dos casos). Há envolvimento preferencial de linfonodos periféricos, sendo incomum o acometimento do mediastino. Apresenta características clínicas sobrepostas às do LHPLN, exceto pela menor ocorrência de recidivas freqüentes.

Morfológicamente, caracteriza-se pela presença de áreas difusas ou nodulares (esta última mais comum) distorcendo a arquitetura linfonodal, constituídas por pequenos linfócitos; eosinófilos e neutrófilos estão normalmente ausentes. Histiócitos podem estar presentes em grande quantidade em casos com padrão de crescimento predominantemente difuso. Nas áreas nodulares, pode-se por vezes distinguir esboços de centros germinativos. As CRS neste subtipo são relativamente escassas, podendo assemelhar-se a células lacunares ou a células L&H. A pesquisa do imunofenótipo da célula neoplásica é crítica nestes casos, uma vez que podem ser facilmente confundidos com o LHPLN.

O **Linfoma de Hodgkin Clássico tipo Depleção Linfocitária (LHDL)** é o subtipo mais raro de LHC, respondendo por menos de 5% dos casos. A média de idade ao diagnóstico (37 anos) e predominância masculina são similares às observadas nos outros subtipos de LHC. É visto com mais freqüência em países em desenvolvimento e em pacientes portadores do HIV.

Morfológicamente, as variantes de LHDL possuem em comum um predomínio de CRS em relação ao fundo inflamatório. Alguns casos possuem CRS intensamente pleomórficas, assemelhando-se a um sarcoma. Outros podem assemelhar-se ao LHCM, mas com um número maior de CRS. Outros ainda podem apresentar fibrose intensa, com ou sem proliferação de fibroblastos e um número escasso de CRS.

### 1.3.2 Linfoma de Hodgkin Predomínio Linfocitário Nodular (LHPLN)

Ao contrário dos subtipos LHEN, LHCM, LHRL e LHDL, que são chamados coletivamente de LHC por conterem CRS diagnósticas, o LHPLN contém poucas (se alguma), CRS. O que se observa são células conhecidas como “L&H”, que estão espalhadas em meio a um *background* de pequenos linfócitos. O termo “célula L&H” foi cunhado por LUKES & BUTLER (1966), no qual a entidade LHPLN foi denominada *Linfoma de Hodgkin tipo Linfocítico e/ou Histiocítico*.

A célula L&H assemelha-se a um histiócito, com núcleo hiperlobado exibindo cromatina finamente dispersa e um nucléolo pequeno em comparação ao macronúcleolo observado na CRS clássica. A lobulação nuclear característica desta célula é responsável pelo outro termo pelo qual ela é conhecida: “Célula Pipoca” (do inglês *popcorn cell*). Devido ao seu aspecto citológico, a célula L&H não é facilmente identificada à microscopia de pequeno aumento.

Clinicamente, o LHPLN pode ocorrer em qualquer faixa etária, sendo a maioria dos casos diagnosticada em adultos. Os linfonodos periféricos são preferencialmente envolvidos, sendo incomum o acometimento do mediastino ou de sítios extra-nodais. A maioria dos pacientes diagnosticados com LHPLN tem doença localizada, com prognóstico excelente em casos de estágio inicial.

Morfologicamente, a grande maioria dos casos apresenta, à microscopia de pequeno aumento, arquitetura de padrão nodular, remanescente da observada no linfoma folicular. Histiócitos estão usualmente presentes em meio ao *background* linfocitário, por vezes formando alguns granulomas, o que pode ser utilizado como dica diagnóstica.



Ao estudo imunoistoquímico, observa-se que as células L&H são positivas para CD20, CD45 e EMA, ao contrário da maioria dos casos de LHC. Raramente algumas células serão positivas para CD30 (entretanto sem o padrão membrana-Golgi observado nas CRS clássicas). Raramente pode-se observar positividade para CD15, mas sua ocorrência deve levantar suspeita sobre a acurácia do diagnóstico. Os linfócitos pequenos presentes no *background* são predominantemente CD20+, ao contrário da população linfocitária presente no LHC, predominantemente do tipo T. As poucas células T presentes no *background* do LHPLN tendem a formar “rosetas” à volta das células L&H, sendo do tipo CD57+.

#### **1.4 VÍRUS DE EPSTEIN-BARR (EBV, do inglês *Epstein-Barr Virus*)**

O EBV é um vírus de distribuição mundial, infectando mais de 90% dos indivíduos que chegam à idade adulta. Foi o primeiro vírus a ser associado a uma neoplasia humana, o Linfoma de Burkitt (BURKITT 1958). A descrição de partículas virais em células neoplásicas de pacientes com Linfoma de Burkitt foi feita por EPSTEIN et al. (1964).

O EBV pertence à família herpesvírus, sendo um vírus DNA de cadeia dupla que apresenta tropismo por linfócitos B e células epiteliais da orofaringe. A infecção dos linfócitos B é latente, não havendo replicação do vírus e morte celular. Anticorpos produzidos contra o EBV presentes em altos títulos no soro correlacionam-se com o diagnóstico de mononucleose infecciosa e outras neoplasias malignas além do linfoma de Burkitt, como carcinoma nasofaríngeo, linfoma de

células B associado à imunossupressão e LH (HENLE et al. 1968; HENLE e HENLE 1985; ZENG 1985).

Inúmeros antígenos têm sido identificados em células infectadas pelo EBV. Em linfócitos B, nos quais a infecção é latente, há expressão de vários genes virais. Um gene expresso virtualmente em toda célula infectada, presente no núcleo como um complexo antigênico viral, é conhecido como EBNA (do inglês *EBV-induced nuclear antigen*) e pode ser utilizado como um marcador imunológico para a presença do DNA viral (REEDMAN e KLEIN 1973). Além disso, o EBV codifica duas proteínas de membrana associadas à infecção latente (LMPs) e dois pequenos RNAs não-poliadenilados (EBERs) que também são expressados por células infectadas pelo EBV.

A proteína LMP-1 é particularmente importante por relacionar-se à immortalização de linfócitos B infectados pelo EBV. Estes apresentam bloqueio da apoptose, devido à superregulação, pela LMP-1, do gene que codifica a proteína bcl-2 (KIEFF 1996).

Os transcritos não-codificantes EBER não têm ainda função estabelecida na literatura.

Estudos epidemiológicos e sorológicos, suportados por estudos moleculares que demonstram a presença de DNA, RNA e proteínas do EBV em células de Reed-Sternberg, sugerem uma associação entre infecção pelo EBV e LH (WEISS et al. 1989; HERBST et al. 1990).

A maior parte dos casos nos quais se detecta a presença do EBV pertence às categorias *celularidade mista* (60-95%) e *esclerose nodular* (40-60%) do LHC (WEISS et al. 1989; HERBST et al. 1990; VASSALO 2000). Os tipos *rico em*

Ao nível molecular, a apoptose é dependente da ativação de uma família de proteases chamadas caspases, que compreendem enzimas iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e enzimas executoras (caspases 3, 6 e 7). A apoptose pode ser desencadeada por duas vias distintas. Uma delas passa pela membrana mitocondrial e envolve a liberação de fatores ativadores, em particular o citocromo c. Os principais controladores deste evento são membros da família bcl-2 (que incluem as proteínas pro-apoptóticas bax, bak, bcl-xs, bid e as anti-apoptóticas bcl-2, bcl-xl, bcl-w e bad, entre outras). Acredita-se que o balanço entre as proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas da família bcl-2 seja responsável pelo controle da via mitocondrial da apoptose (JON GESKE & GERSCHENSON 2001). A cascata de caspases pode também ser iniciada na membrana plasmática por ativação dos receptores de morte da família do receptor do fator de necrose tumoral, que inclui o sistema fas-fas ligante. O fasL é produzido por células imunes e, ao ligar-se a fas, faz com que esta molécula forme um domínio de ligação para outra proteína chamada FADD (do inglês *Fas-associated death domain*). FADD ativa a pró-caspase 8, iniciando a cascata de caspases que leva à morte celular (KUMAR et al. 2005).

Tendo sido objeto de numerosos estudos, ficou claro que, além de sua participação na fisiologia do organismo, a apoptose tem também papel crucial no processo de tumorigênese.

### **1.5.1 Papel na Fisiologia Normal**

Exemplos proeminentes de apoptose fisiológica incluem a involução das células que formam a membrana interdigital no embrião, a morte de numerosos neurônios durante o processo de organização do sistema nervoso central e a seleção



negativa de linfócitos para eliminação de células não-reativas ou auto-reativas (esta última discutida acima no item 1.2.1).

Além disso, o processo de apoptose pode ser desencadeado em resposta a um agente lesivo (radiação, drogas citotóxicas) que provoque alterações no DNA que não possam ser revertidas pelo sistema de reparo, do qual participa a proteína p53. A proteína p53 pode atuar como um fator de transcrição, sendo duas de suas atividades mais bem caracterizadas a indução da parada do ciclo celular e apoptose. Os níveis de p53 se elevam rapidamente após um dano ao DNA, principalmente porque a proteína p53, de vida curta em condições normais, se torna estabilizada, isto parecendo ser um componente essencial da resposta de parada em G1 e apoptose que se seguem ao dano ao DNA (MORGAN et al. 2002). A apoptose induzida por p53 pode ser iniciada via indução da transcrição de outros genes pró-apoptóticos e de ativação de caspases (JON GESKE e GERSCHENSON 2001).

### **1.5.2 Papel na Tumorigênese**

Uma das características da célula tumoral é a capacidade de evitar o processo de apoptose (HANAHAN e WEINBERG 2000). A necessidade do bloqueio da apoptose pode ser parcialmente explicada pelo fato da célula tumoral estar sujeita à ativação das caspases devido à desregulação de seu ciclo (em função, por exemplo, de uma atividade aumentada de oncoproteínas ou de uma inativação de proteínas supressoras de tumor, levando a uma atividade proliferativa elevada). Os sinais de estímulo proliferativo devem, portanto, estar associados a uma redução do potencial de morte (EVAN & VOUSDEN 2001). Em vista disto, tem-se observado que numerosos tumores possuem inúmeras mutações em genes pró-apoptóticos e/ou



mostram um aumento da atividade de proteínas anti-apoptóticas. Por exemplo, mutações no gene p53, pro-apoptótico, são das mais freqüentes anormalidades genéticas em neoplasias humanas (EVAN & VOUSDEN 2001). Outras alterações comuns envolvem o balanço da atividade de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família bcl-2, que controlam a liberação de citocromo c (JÄATELA 1999; REED 2001), e a expressão de proteínas que inibem a via extrínseca da apoptose, como a proteína de multiresistência a drogas/glicoproteína P e c-FLIP (IRMLER et al. 1997; LANDOWSKI et al. 1997; RUEFLI et al. 2000).

## **1.6 ÓXIDO NÍTRICO E SEU PAPEL NA BIOLOGIA TUMORAL**

### **1.6.1 Óxido Nítrico e Suas Sintases**

O óxido nítrico (ON) é um radical livre diatômico, que tem como característica a presença de um elétron não pareado em sua órbita externa, que possibilita a sua reação com numerosas moléculas no organismo, incluindo outros radicais livres, oxigênio e metais pesados (BENTZ et al. 2000). A geração de ON é catalizada por uma família de enzimas, conhecidas como sintases do óxido nítrico (NOS), e requer uma gama de substratos e co-fatores.

Três diferentes isoformas das NOS foram identificadas, sendo denominadas NOS1 ou nNOS; NOS2 ou iNOS; e NOS3 ou eNOS. As isoformas NOS1 e NOS3 são também conhecidas como formas constitutivas, por serem expressas constitutivamente por vários tipos celulares, sendo necessário aumento nos níveis intracelulares de cálcio para sua ativação. A NOS2, ao contrário, é cálcio-independente e pode ser regulada ao nível transcricional por diversos fatores como

citocinas, fator de necrose tumoral (TNF-alfa), endotoxinas bacterianas e stress oxidativo (XU & LIU 1998).

As atividades fisiológicas do ON no organismo estão ligadas à dependência ou não de interação com o grupo heme da enzima guanilato ciclase, com conseqüente produção de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Atividades que requerem esta enzima incluem a regulação da pressão arterial e o processo de neuromodulação do sistema nervoso central. Já o processo de angiogênese estimulado pelo óxido nítrico é cGMP-independente (BENTZ et al. 2000).

### **1.6.2 Papel do Óxido Nítrico e Suas Sintases nas Neoplasias Malignas**

O interesse pelo papel do ON e de suas sintases na gênese e progressão das neoplasias malignas deriva, sobretudo, das seguintes características:

- a) O ON é capaz de provocar dano ao DNA, através da geração de peroxinitrito (ONOO-) e  $N_2O_3$ . O peroxinitrito é capaz de oxidar e nitrificar o DNA.  $N_2O_3$  pode nitrosilar animas para formar N-nitrosaminas, alquilando o DNA. (XU et al. 2002).
- b) O NO tem efeitos sobre o processo de metástase por provocar dano ao endotélio e estimular a angiogênese. O ON é necessário para a expressão de VEGF (XU et al. 2002).
- c) Com relação a apoptose, verificou-se que o papel do óxido nítrico pode ser estimulatório ou inibitório, dependente principalmente do tipo celular envolvido (KIM et al. 2001). Em linhagens de linfócitos B, a produção de ON inibe a apoptose e reativação do vírus Epstein-Barr (MANNICK et al. 1994).

O ON é também capaz de inibir a atividade das caspases por s-nitrosilação de sítios ativos de cisteína (KIM et al. 2001). Há ainda estudos que mostram que o ON é capaz de modular os níveis de bcl-2 e bax, influenciando então de maneira positiva ou negativa no processo de apoptose, seja regulando a atividade das caspases, seja por diminuição da transcrição de p53, que diminui os níveis de bax e aumenta os de bcl-2. Além disso, ele pode também modular o sistema fas-fasL, impedindo a interação de fas com seu ligante (BRUNE et al. 1998).

Em função do exposto acima, a expressão de NOS e produção de ON por neoplasias humanas têm sido objeto de numerosos estudos. As isoformas de NOS têm sido detectadas em tumores da mama (VAKKALA et al. 2000; MACIEL 2002), adenomas e carcinomas do cólon (AMBS 1998a), carcinomas gástricos (BEGNAMI 2003), esfôfago de Barrett e adenocarcinomas esofágicos (WILSON et al. 1998), de cabeça e pescoço (ROSBIE et al. 1995; FISCHER 2003), próstata (KLOTZ et al. 1998) e bexiga (SWANA et al. 1999; FONSECA 2002), entre outros.

## 2 OBJETIVOS

Face à revisão de literatura exposta acima, o objetivo do presente trabalho é o de analisar a expressão das sintases do óxido nítrico (NOS1, NOS2), de nitrotirosina, de proteínas ligadas à apoptose (p53, bcl-2, bax, fas, fasL) e a frequência de infecção pelo EBV no Linfoma de Hodgkin forma clássica, correlacionando-os com as variáveis clinicopatológicas em pacientes portadores de LH tratados no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo.

Pretende-se ainda estudar-se a expressão das sintases do óxido nítrico (NOS1 e NOS2) e de nitrotirosina no Linfoma de Hodgkin forma predomínio linfocitário nodular.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Foram selecionados 238 casos de LHC do arquivo do Departamento de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo, Fundação Antonio Prudente, no período de 1980 a 2001. Foram resgatadas todas as respectivas lâminas e blocos de parafina. Blocos representativos da neoplasia foram selecionados, sendo confeccionadas novas lâminas. A primeira lâmina confeccionada foi corada pela técnica tradicional de hematoxilina-eosina (H&E). A revisão da lâmina permitiu a confirmação morfológica do diagnóstico de LHC e determinação do subtipo histológico de acordo com a classificação da OMS (JAFFE et al. 2001). As demais lâminas confeccionadas foram submetidas a estudo imunoistoquímico para confirmação do diagnóstico morfológico, que incluiu marcadores de células B (CD20), de células T (CD3) e de CRS (CD15 e CD30). Quando necessário, demais marcadores de antígenos linfóides foram utilizados (ALK1, CD23). Casos cujos blocos não continham tecido suficiente para realização das reações imunoistoquímicas, casos de recidiva, e associados à infecção pelo vírus HIV foram excluídos. Foram selecionados ainda 07 casos com critérios diagnósticos de LHPLN, ou seja, linfomas de padrão nodular, com células L&H e expressão de CD20 e EMA, e o infiltrado inflamatório constituído quase que exclusivamente de linfócitos, com imunofenótipo B. Destes casos foram confeccionadas novas lâminas para estudo imunoistoquímico dos marcadores sintases do óxido nítrico 1 e 2 (NOS1 e NOS2) e

nitrotirosina. Os prontuários médicos dos casos selecionados para o estudo foram revistos, coletando-se em ficha padronizada informações como idade, gênero e tratamento proposto (Anexo A). A análise de sobrevida foi realizada agrupando-se os pacientes como vivos sem doença, vivos com doença e mortos pela doença. Pacientes mortos por outra causa ou perdidos de vista foram devidamente censurados.

### 3.2 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

O estudo imuno-histoquímico foi realizado com os anticorpos que reconhecem as isoformas das sintases do óxido nítrico e de painel de proteínas ligadas à apoptose, que incluem as proteínas p53, fas, fasL, bcl-2 e bax. Foi pesquisada ainda a expressão de nitrotirosina, subproduto do metabolismo do óxido nítrico, e portanto evidência indireta da produção deste pelas células. Além disso, todos os casos foram pesquisados para expressão de proteína latente de membrana-1, que identifica a infecção pelo EBV. A tabela 1 apresenta a lista completa dos anticorpos com respectivos clones e origem de fabricação, diluição, método de recuperação antigênica, controle positivo, e critério para determinação de positividade.

Foi também realizada hibridação *in situ* para todos os casos com sonda EBER-1, como ferramenta adicional para detecção de infecção pelo EBV.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO). Os passos técnicos

realizados foram os já tradicionalmente descritos na literatura estão detalhados abaixo:

1. Desparafinização dos cortes histológicos com 3um de espessura do material incluído em parafina e colocados em lâminas silanizadas (3-aminopropyl-triethoxy-silane-SIGMA) e deixados por 24h em estufa a 60°C.
2. Duas passagens em xilol (60°C e em temperatura ambiente).
3. Seis passagens em etanol (a 100%, 95%, 80% e 70%) sendo três delas a 100%.
4. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
5. Incubação em tampão citrato (microondas, panela de pressão, steamer).
6. Bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (água oxigenada 10 volumes).
7. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
8. Aplicação de solução salina tamponada com fosfatos.
9. Incubação com anticorpo primário, diluído em título previamente estabelecido, em tampão PBS contendo albumina bovina BSA a 1% (SIGMA) e azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,1%, em câmara úmida (16 a 18 horas).
10. Lavagem em tampão PBS.
11. Incubação com anticorpo biotilado-reagente C, do kit StreptABCComplex/HRP Duet (DAKO).
12. Lavagem em tampão PBS.
13. Incubação das lâminas em solução substrato cromógeno: 3,3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60mg (SIGMA);

Dimetilsulfóxido (DMSO) 1ml; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6% (água oxigenada 20 volumes) 1ml; PBS 100ml (5min, 37<sup>o</sup>C, ao abrigo da luz).

14. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
15. Contracoloração com hematoxilina de Harris.
16. Imersão em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio a 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.
17. Desidratação (6 passagens em etanol a 50%, 80%, 95% e 100%, sendo 3 delas a 100%).
18. Montagem das lâminas.

Nas reações que não necessitaram de recuperação antigênica, a quinta etapa (recuperação antigênica pelo calor) não foi realizada, seguindo imediatamente à desparafinização o bloqueio da peroxidase endógena.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum. Na avaliação de NOS1, NOS2, bcl-2, bax, fas e fasL os resultados foram classificados em relação à intensidade da reação e número de células positivas (SOINI et al. 2001). Esta gradação pode ser vista nas tabelas 2 e 3. O escore final é estabelecido pela somatória dos graus, sendo considerado caso negativo aquele cujo escore situar-se entre 0-2, fracamente positivos aqueles com somatória entre 3 e 4, e fortemente positivos os casos cuja somatória for maior do que 4. Na avaliação de p53, foram considerados positivos os casos em que mais de 10% das CRS apresentaram marcação nuclear para este anticorpo. Na avaliação de LMP-1 e nitrotirosina, foram considerados positivos os casos que apresentaram qualquer marcação nas CRS.



Tabela 1: Anticorpos utilizados, com referências ao clone, fabricante, diluição, método de recuperação antigênica, controles positivos e critério de positividade

ANTICORPO	CLONE	FABRICANTE	DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO	CONTROLE POSITIVO	CRITÉRIO DE POSITIVIDADE
Nos1	POLYCLONAL	Transduction Lab	1/50	Panela de pressão	Neurônios	Ver texto
Nos2		Transduction Lab	1/25	Panela de pressão	Células gigantes (reação de corpo estranho)	Ver texto
Nitrotirosina	1A6	Upstate	1/1000	Panela de pressão	Células gigantes (reação de corpo estranho)	Qualquer marcação citoplasmática nas CRS e variantes
p53	DO7	Dako	1/100	Panela de pressão	Células do centro germinativo	> 10% de células positivas (marcação nuclear)
bcl-2	124	Dako	1/40	Panela de pressão	Pequenos linfócitos	Ver texto
bax	POLYCLONAL	Dako	1/100	Panela de pressão	Linfócitos B	Ver texto
fas	Dx3	Dako	1/200	Panela de pressão	Pequenos linfócitos	Ver texto
fasL	POLYCLONAL	Santa Cruz	1/200	Panela de pressão	Pequenos linfócitos	Ver texto
LMP-1	CS1-4	Novocastra	1/100	Panela de pressão	Carcinoma nasofaríngeo EBV-positivo	Qualquer marcação citoplasmática/membrana nas CRS e variantes

**Tabela 2** - Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com a intensidade.

Característica	Grau
Coloração negativa	0
Coloração de intensidade fraca	1
Coloração de intensidade moderada	2
Coloração de intensidade forte	3
Coloração de intensidade muito forte	4

**Tabela 3** - Gradação da reação imunoistoquímica de acordo com o número de células coradas.

Característica	Grau
Nenhuma célula positiva	0
<10% das células positivas	1
10-50% das células positivas	2
51-90% das células positivas	3
>90% das células positivas	4

A técnica de hibridação *in situ* (ISH) foi realizada para detecção de transcritos do genoma do EBV. Para tal foi utilizada a sonda de oligonucleotídeo EBER (Epstein-Barr virus encoded RNA, NCL-EBV, Novocastra<sup>®</sup>), marcada com fluoresceína, sobre os cortes histológicos parafinados. A revelação da reação foi feita com o kit de detecção de HIS para sondas fluoresceinadas (NCL-ISH-D, Novocastra, UK). Por se tratar de kits, o procedimento foi seguido rigorosamente como indica o fabricante, descrito a seguir:

1. Desparafinização dos cortes em xilol, 2 passagens de 3 minutos cada.
2. Hidratação em etanol 99%, 2 passagens de 3 minutos cada.
3. Hidratação em etanol 95%, 2 passagens de 3 minutos cada.
4. Imersão em água por 3 minutos.
5. Incubação dos cortes em 100um de proteinase K em tampão Tris-HCl 0,05M, pH7,6 por 10 a 15 minutos a 37°C.
6. Imersão em água, 2 passagens de 3 minutos cada.
7. Desidratação em etanol 95% por 3 minutos.
8. Desidratação em etanol 99% por 3 minutos.
9. Secagem do corte ao ar.
10. Aplicação de 20ul de sonda, cobrindo-se os cortes com lamínula, deixando-se por toda a noite a 37°C (cerca de 16 horas).
11. Retirada das lamínulas delicadamente com tampão.
12. Lavagem em tampão 0,05M Tris-HCl 0,3M NaCl, pH7,6 (TBS) com 0,1% de TritonX-100 em 3 passagens de 3 minutos cada.
13. Aplicação de 100ul de tampão TBS com soroalbumina bovina (BSA) a 3%, 0,1% de Triton X-100 e 20% de soro normal de coelho por 10 minutos.
14. Retirada do excesso de soro normal e, sem lavagem, aplicação de anticorpo anti-fluoresceína diluído a 1:150 em tampão TBS com BSA a 3% e Triton X-100 a 0,1%; incubação por 30 minutos.
15. Lavagem dos cortes em tampão TBS, 2 passagens de 3 minutos cada.
16. Lavagem dos cortes em tampão do substrato da fosfatase alcalina pH 9,0 por 5 minutos;

17. Incubação com substrato da fosfatase alcalina (BCIP-NBT, 5 bromo-4-chloro-3-indolylphosphate e nitroblue tetrazolium), preparado a 1:150 em tampão Tris-HCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 50mM, NaCl 100mM, pH9,0, além de 1 ul de Levamisole (inibidor de fosfatase alcalina) para cada ml de substrato; incubar por toda a noite (cerca de 16 horas), à temperatura ambiente.
18. Lavagem em água corrente por 5 minutos.
19. Contra-coloração com hematoxilina de Meyer por um minuto.
20. Passagem em água amoniacal por segundos.
21. Montagem em meio aquoso.

A visualização da reação de HIS é expressa através da coloração enegrecida do núcleo das células tumorais. Como nas reações imunohistoquímicas, foram coradas simultaneamente uma lâmina com controle positivo externo e outra com controle negativo (a mesma lâmina do controle positivo com aplicação de tampão TBS no lugar dos anticorpos primários e da sonda EBER), para validar a reação. Foram considerados positivos os casos em que mais de 10% das células neoplásicas apresentaram marcação nuclear para o transcrito do EBV.

### **3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos do estudo dos diversos marcadores foram colocados em tabelas e a análise estatística foi realizada utilizando-se os programas de computador GraphPad Prism v.4.02 (Graphpad Software Inc. USA, 2000) e SPSS v.12.0 (SPSS Inc. USA, 2003). Foram realizados para a análise de comparação entre os grupos e os marcadores biológicos o teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. O nível de



significância foi estabelecido para  $\alpha < 0,05$ . O cálculo da estimativa de sobrevida foi realizado através da técnica de Kaplan & Meyer. Comparações entre as curvas de probabilidade de sobrevida acumulada para categorias de uma mesma variável foram realizadas pelo teste de log rank.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO**

#### **4.1.1 Caracterização da amostra e correlação entre parâmetros clínicos**

Dos 238 casos selecionados inicialmente, 171 puderam ser avaliados. Os resultados em relação às variáveis de caracterização da amostra examinada estão apresentados na tabela 4. Dos 171 casos de Linfoma de Hodgkin, observou-se que 97 (56.7%) deles acometiam indivíduos do sexo masculino e 74 (43.3%) acometiam indivíduos do sexo feminino. A média de idade observada foi de 26,6 anos (mínima de 3 e máxima de 92 anos), sendo a mediana de 23 anos. O subtipo histológico mais frequente foi a Esclerose Nodular (LHEN), compreendendo 93 casos (54.4%), seguido pelo subtipo Celularidade Mista (LHCM), com 60 casos (35.1%). A maioria dos casos diagnosticados encontrava-se estádios avançados, com 35.1% deles (n=60) no estádio III e 17.5% (n=30) no estádio IV. Os sintomas B foram verificados em aproximadamente 50% dos casos (n=85).

Observou-se correlação entre sintomas B e estádios mais avançados (III-IV) da doença ( $p=0,0011$ ). Não houve correlação entre estádio da doença e sexo, gênero ou tipo histológico; e entre tipo histológico, sexo, gênero ou sintomas B.

#### 4.1.2 Resultados por antígenos pesquisados

Todas as análises foram feitas nas células de Hodgkin e de Reed-Sternberg. O resultado geral da análise dos marcadores está sumarizado na tabela 5. Fotomicrografias de exemplos de casos positivos para cada um dos marcadores estão no item 5 (Figuras dos resultados). Os resultados em relação ao número de casos avaliáveis em cada grupo estão descritos abaixo:

**EBV:** Na avaliação por imunoistoquímica, 85 casos (49,7%) apresentaram marcação positiva para o anticorpo anti-LMP1. A pesquisa do transcrito EBER1 por hibridização in situ foi positiva em 80 casos (46,8%).

**VIA MITOCONDRIAL DA APOPTOSE:** O antígeno bcl-2 foi positivo em 35,1% dos casos (n=60). A marcação foi considerada fracamente positiva em 34 casos (19,9%) e fortemente positiva em 26 casos (15,2%). Bax foi positivo em 44,4% dos casos (n=76), sendo fracamente positivo em 57 casos (33,3%) e fortemente positivo em 19 casos (11,1%).

**VIA DO RECEPTOR DE MORTE:** Fas foi positivo em 93,6% dos casos (n=160), sendo fracamente positivo em 15 casos (8,8%) e fortemente positivo em 145 casos (84,8%). O antígeno fasL foi positivo em apenas 5,8% dos casos (n=10). A imunomarcação foi fraca em 6 casos (3,5%) e forte em 4 casos (2,3%).

**PROTEÍNA p53:** 44,4% dos casos (n=76) apresentaram marcação positiva para este anticorpo.

**NOS1:** 42,1% dos casos (n=72) foram positivos para este marcador em um padrão de marcação citoplasmático, ocasionalmente com reforço na região do complexo de Golgi. A intensidade da reação foi fraca em 62 casos (36,3%) e forte em 10 casos (5,8%).

**NOS2:** 55% dos casos (n=94) foram positivos, sendo a expressão fraca em 69 casos (40.4%) e forte em 25 casos (14.6%). Observou-se um padrão de marcação citoplasmático granular.

**NITROTIROSINA:** O subproduto do metabolismo da reação do óxido nítrico foi detectado em 18.7% dos casos (n=32) em um padrão de marcação citoplasmático. A expressão foi fraca, em CRS ocasionais.

#### **4.1.3 Correlação entre os antígenos e características clínico-morfológicas**

Os resultados da análise estão descritos na Tabela 6.

**RELAÇÃO COM O GÊNERO DO PACIENTE:** Não se observou associação de p53, bcl-2, bax e fasL com o gênero do paciente. Houve forte associação entre a presença de EBV e o sexo masculino, tanto na análise com ISH-EBER1 ( $p < 0,0001$ ) quanto na análise com imunohistoquímica anti-LMP1 ( $p < 0,0001$ ). Observou-se também associação de fas e sexo masculino ( $p = 0,032$ ).

**RELAÇÃO COM O ESTADIO DA DOENÇA:** Não se observou associação de p53, bcl-2, bax, fas e fasL com o estadio da doença. A presença de EBV correlacionou-se com estádios mais avançados (ISH-EBER com  $p = 0,0011$ ; LMP-1 com  $p = 0,0459$ ).

**RELAÇÃO COM SINTOMAS B:** Não se observou correlação entre sintomas B e p53, bcl-2, bax, fas ou fasL. A presença de EBV correlacionou-se com a apresentação de sintomas B quando avaliada por ISH-EBER ( $p = 0,0481$ ), mas não por imunohistoquímica anti-LMP-1.



**RELAÇÃO COM TIPO HISTOLÓGICO:** Pelo método de hibridização *in situ*, observou-se associação entre EBV com o tipo celularidade mista, quando analisados todos os tipos ( $p=0,0022$ ) e quando analisado isoladamente com o tipo esclerose nodular ( $p=0,0001$ ). Pelo método imunistoquímico contra o antígeno LMP-1, a mesma associação com o tipo celularidade mista foi observada ( $p<0,0001$ ). Os antígenos bcl-2, bax, p53, fas e fasL não apresentaram relação com o tipo histológico.

#### **4.1.4 Correlação entre os marcadores de apoptose**

Os resultados da análise estão descritos na Figura 1.

Observou-se correlação entre p53 e Bax ( $p=0,036$ ), e entre bax e fasL ( $p=0.046$ ).

#### **4.1.5 Correlação entre os marcadores de apoptose e EBV**

Os resultados da análise estão descritos na Figura 1.

Não se observou correlação entre o status do EBV e os marcadores p53, bax, fas e fasL, tanto na análise utilizando EBER quanto na análise utilizando LMP-1. Houve correlação inversa entre EBV e bcl-2 (LMP1,  $p=0,002$ ; EBER,  $p=0,006$ ).

#### **4.1.6 Correlação entre os marcadores e a expressão NOS**

Os resultados da análise estão descritos na Figura 1.

Observou-se associação entre bax e NOS2 ( $p=0.022$ ), entre bcl-2 e NOS2 ( $p=0.034$ ), e entre p53 e NOS1 ( $p=0.006$ ). Correlação inversa foi estabelecida entre EBV (LMP-1) e NOS2 ( $p=0.018$ ).

#### 4.1.7 Análise da sobrevida global em relação aos antígenos pesquisados

Para análise de sobrevida global, foram considerados EBV positivos apenas os casos que apresentaram marcação simultânea para EBER e LMP-1, e considerados negativos os casos que não apresentaram marcação para nenhum dos mesmos marcadores. Para análise dos anticorpos bcl-2, bax, fas e fasL, os casos com marcação fraca e forte foram agrupados em uma mesma categoria (considerados positivos). Na avaliação de NOS1 e NOS2, apenas os casos com forte marcação para estes anticorpos foram considerados positivos.

Observou-se uma menor sobrevida global associada à forte expressão de NOS2 ( $p=0.0098$ ). Estratificando-se os casos segundo o regime quimioterápico adotado, observou-se que a forte expressão de NOS2 estava associada a um pior prognóstico nos casos tratados com o esquema quimioterápico MOPP/ABVD ( $p=0.0003$ ).

Não se observou alteração na curva de sobrevida global dos pacientes segundo a expressão de NOS1, EBV, bcl-2, bax, p53, fas ou fasL.

Figuras representativas da curva de sobrevida global segundo a expressão de NOS2 e segundo a expressão de NOS2 após estratificação por regime quimioterápico adotado podem ser visualizadas no item 5 (figuras dos resultados).

## **4.2 LINFOMA DE HODGKIN PREDOMÍNIO LINFOCITÁRIO NODULAR**

### **4.2.1 Caracterização da amostra**

Dos 7 casos de LHPLN, observou-se que 4 (57,1%) deles acometiam indivíduos do sexo masculino e 3 (42,9%) acometiam indivíduos do sexo feminino. A média de idade observada foi de 27,3 anos (mínima de 7 e máxima de 56 anos), sendo a mediana de 26 anos.. Sintomas B foram verificados em 2 casos (28,6%).

### **4.2.2 Análise dos resultados por antígenos pesquisados**

Os resultados globais podem ser apreciados na tabela 7. Fotomicrografias representativas podem ser vistas no item 5 (Figuras dos resultados). Observou-se positividade para NOS1 em 3 dos 7 casos avaliados (42,9 %), sendo a imunomarcção de baixa intensidade. Com relação à expressão de NOS2, observou-se positividade em 5 casos (71,4%), sendo de forte intensidade em 1 caso e de baixa intensidade em 4 casos. Tanto a expressão de NOS1 quanto a de NOS2 apresentaram um padrão de marcação difuso no citoplasma.

Não houve positividade para nitrotirosina nos casos incluídos neste estudo.

**Tabela 5** - Aspectos clínico-patológicos de 171 casos de LHC.

Parâmetro		No.	%
Gênero	Masculino	97	56,7
	Feminino	74	43,3
Tipo histológico	Inclassificável	11	6,4
	Rico em linfócitos	3	1,8
	Celularidade mista	60	35,1
	Depleção linfocitária	4	2,3
	Esclerose nodular	93	54,4
Estadio	I	10	5,8
	II	48	28,1
	III	60	35,1
	IV	30	17,5
	N/A	23	13,5
Sintomas B	não	79	46,2
	sim	85	49,7
	N/A	7	4,1
Total		171	100,0

N/A: dados não disponíveis



**Tabela 6 - Resultado geral dos marcadores em 171 casos de LHC.**

Anticorpo	Resultado	No.	%
Nos1	negativo	89	52,0
	positivo (fraco)	62	36,3
	positivo (forte)	10	5,8
	N/A	10	5,8
Nos2	negativo	56	32,7
	positivo (fraco)	69	40,4
	positivo (forte)	25	14,6
	N/A	21	12,3
Nitrotirosina	negativo	129	75,4
	positivo	32	18,7
	N/A	10	5,8
p53	negativo	94	55,0
	positivo	76	44,4
	N/A	1	0,6
bcl-2	negativo	104	60,8
	positivo (fraco)	34	19,9
	positivo (forte)	26	15,2
	N/A	7	4,1
bax	negativo	88	51,5
	positivo (fraco)	57	33,3
	positivo (forte)	19	11,1
	N/A	7	4,1
fas	negativo	4	2,3
	positivo (fraco)	15	8,8
	positivo (forte)	145	84,8
	N/A	7	4,1
fasL	negativo	159	93,0
	positivo (fraco)	6	3,5
	positivo (forte)	4	2,3
	N/A	2	1,2
EBV (LMP1)	negativo	84	49,1
	positivo	85	49,7
	N/A	2	1,2
EBV (EBER)	negativo	85	49,7
	positivo	80	46,8
	N/A	6	3,5
<b>Total</b>		<b>171</b>	<b>100,0</b>

N/A: casos não avaliáveis

**Tabela 7** - Correlação entre antígenos pesquisados e características clinicopatológicas em 171 casos de LHC (valores de p, testes de  $\chi^2$  ou exato de Fisher).

Parâmetro		NOS1	NOS2	p53	bcl-2	bax	fas	fasL	LMP-1	EBER
Gênero	Masculino	ns	ns	ns	ns	ns	0.032	ns	<0.0001	<0.0001
	Feminino	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tipo histológico	Inclassificável	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Rico em linfócitos	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Celularidade									
	mista	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0.0001	<0.0001
	Depleção									
	linfocitária	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Esclerose									
	nodular	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
stadio	I-II	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	III-IV	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.0459	0.0011
Anticorpos B	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.0481

: Correlação não significativa estatisticamente.

**Tabela 8** - Expressão imunoistoquímica das NOS e de nitrotirosina em 7 casos de LHPLN.

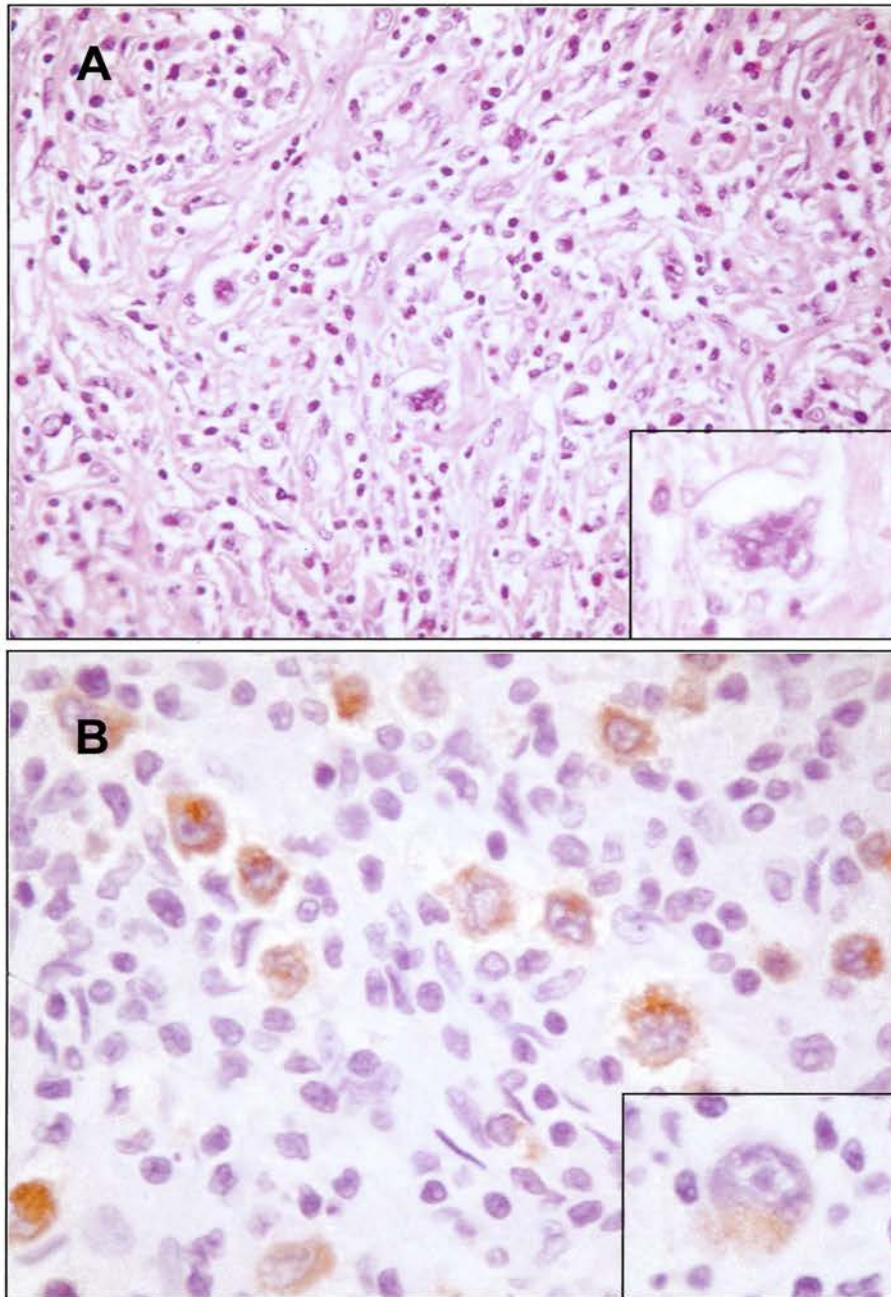
Anticorpo	Resultado	No.	%
Nos1	Negativo	3	42,9
	positivo (fraco)	3	42,9
	positivo (forte)	0	0,0
	N/A	1	14,3
Nos2	negativo	1	14,3
	positivo (fraco)	4	57,1
	positivo (forte)	1	14,3
	N/A	1	14,3
Nitrotirosina	negativo	5	71,4
	positivo	0	0,0
	N/A	2	28,6
Total		7	100,0

N/A: Casos não avaliáveis

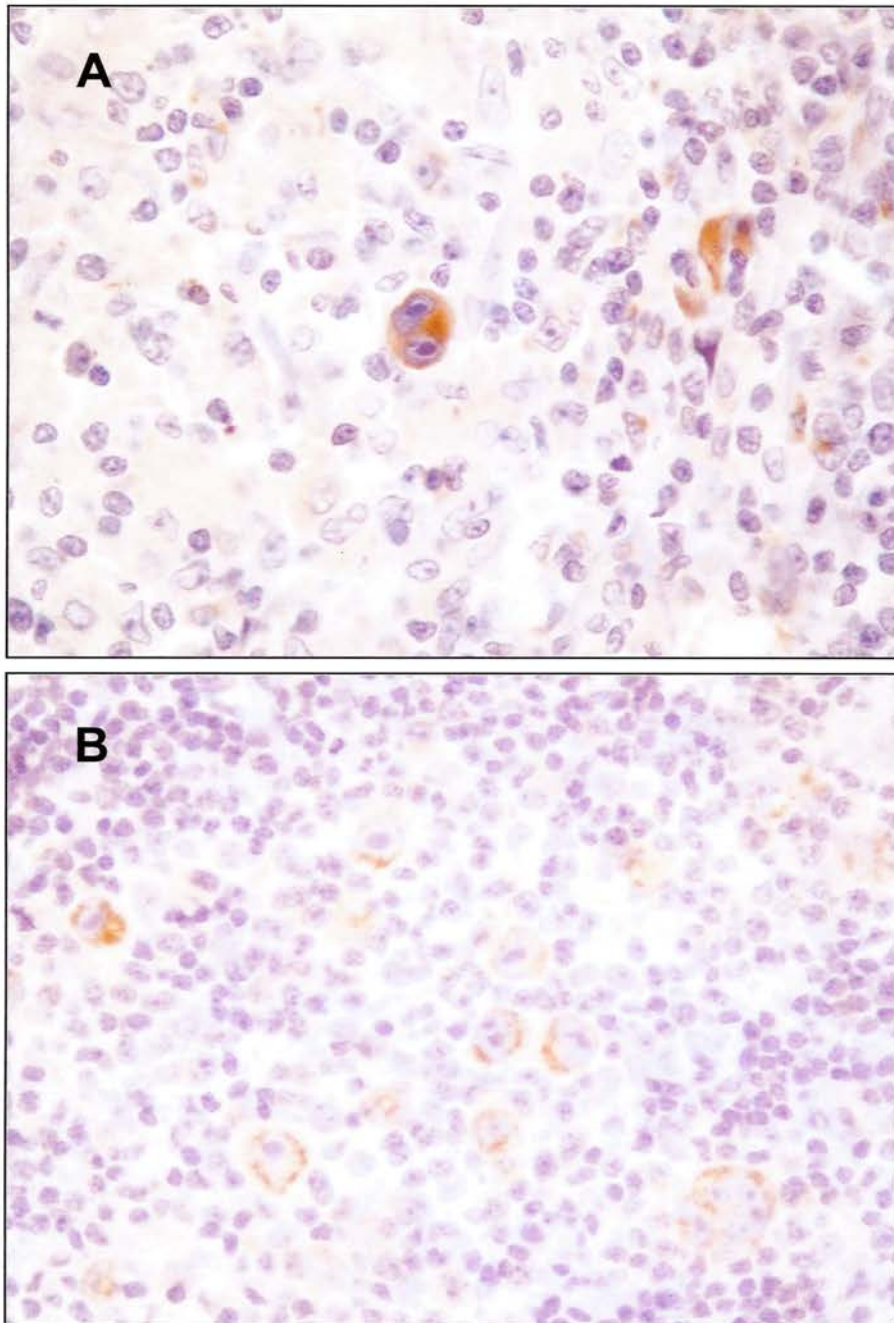
	NOS1									
NOS1		NOS2								
NOS2	ns		p53							
p53	<i>0.006</i>	ns		bcl-2						
bcl-2	ns	<i>0.034</i>	ns		bax					
bax	ns	<i>0.022</i>	<i>0.036</i>	ns		fas				
fas	ns	ns	ns	ns	ns		fasL			
fasL	ns	ns	ns	ns	<i>0.046</i>	ns		LMP1		
LMP1	ns	<i>0.018</i>	ns	<i>0.002</i>	ns	ns	ns		EBER	
EBER	ns	ns	ns	<i>0.006</i>	ns	ns	ns	ns		

**Figura 1** - Correlações entre pares de marcadores em 171 casos de LHC (valores de p, testes de  $\chi^2$  ou exato de Fisher). Correlações inversas estão indicadas em itálico. ns: Correlação estatisticamente não significativa.



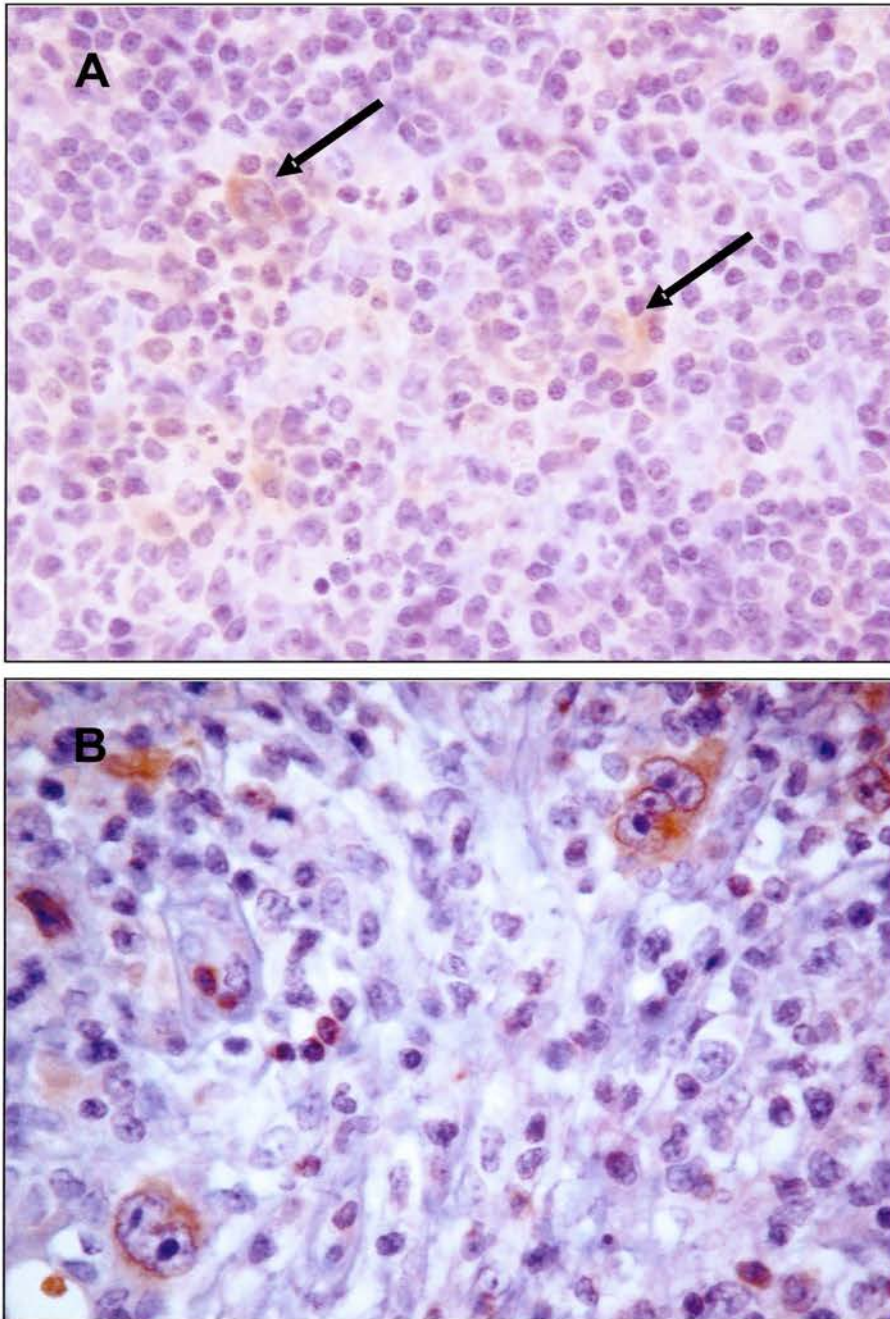


**Figura 2** - LHC. (A) H&E: LHC, esclerose nodular (100x). No detalhe, célula lacunar (400x). (B) IHQ: CRS positivas para CD30 (400x). No detalhe, marcação para CD15 (400x).

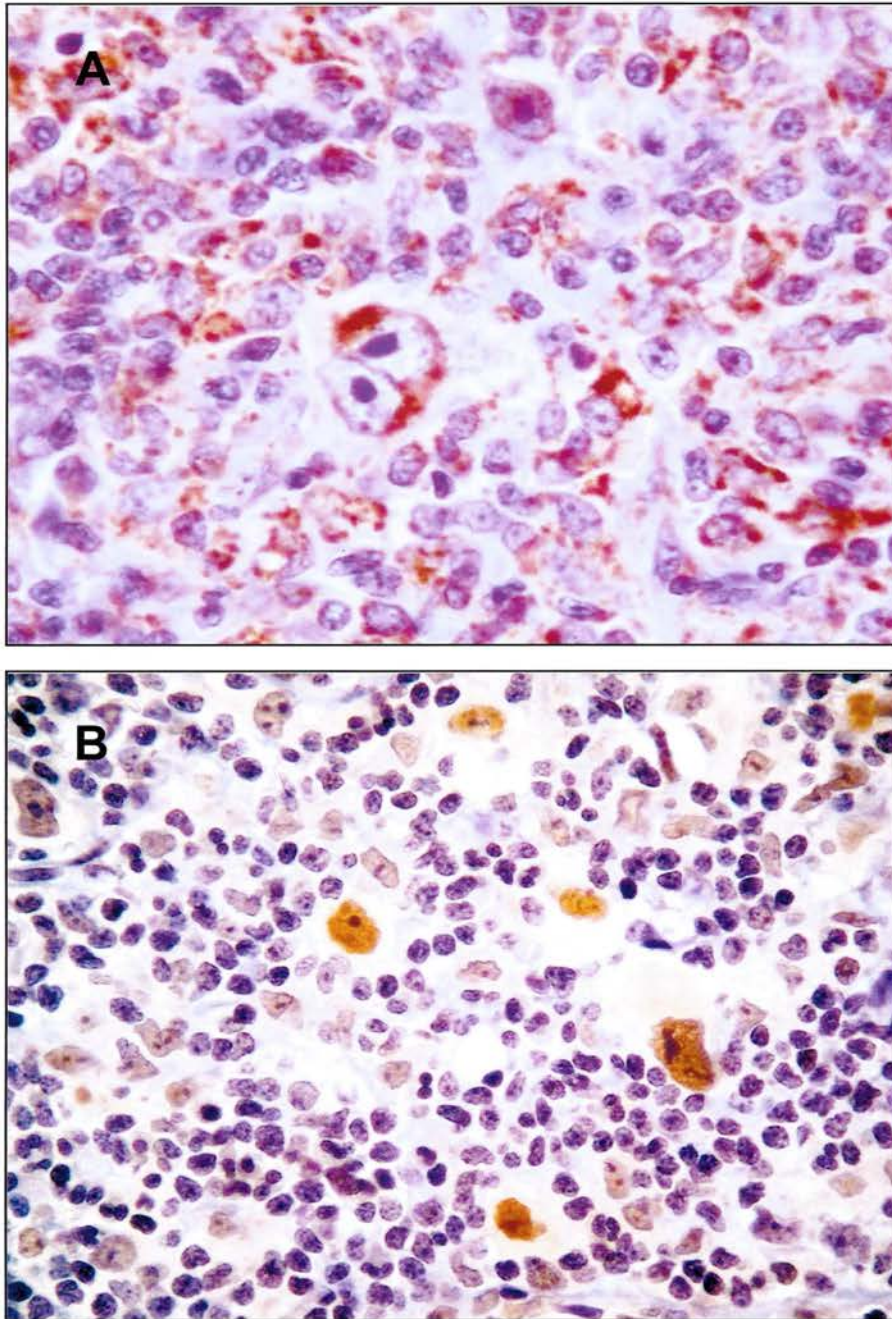


**Figura 3** - LHC. (A) IHQ - NOS1: CRS demonstrando marcação citoplasmática, com reforço na região do complexo de Golgi (400x). (B) IHQ - NOS2: CRS apresentando padrão de marcação granular, citoplasmático (400x).



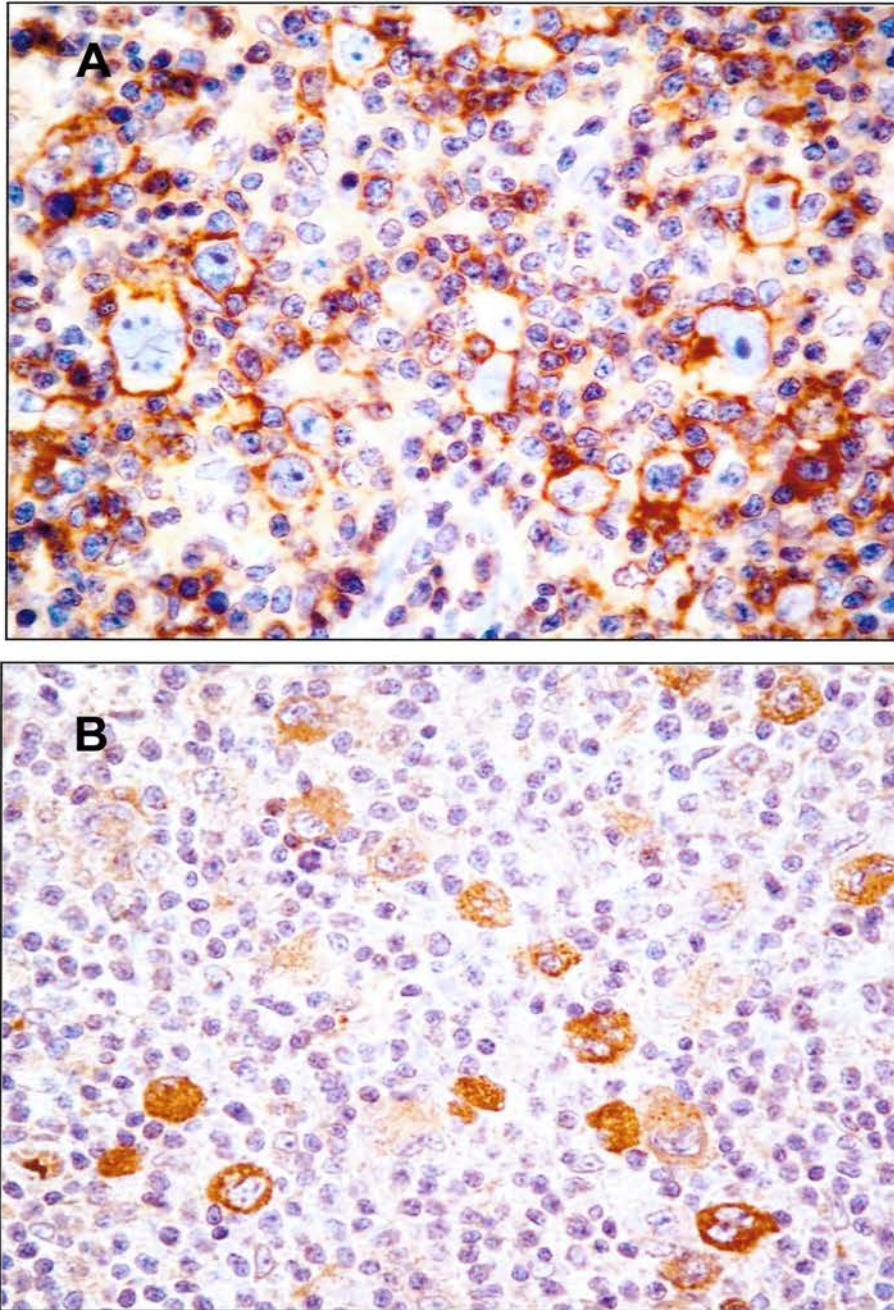


**Figura 4** - LHC. (A) IHQ - Nitrotirosina: CRS (setas) demonstrando marcação citoplasmática (400x). (B) IHQ - bcl-2: CRS apresentando padrão de marcação citoplasmático (400x).

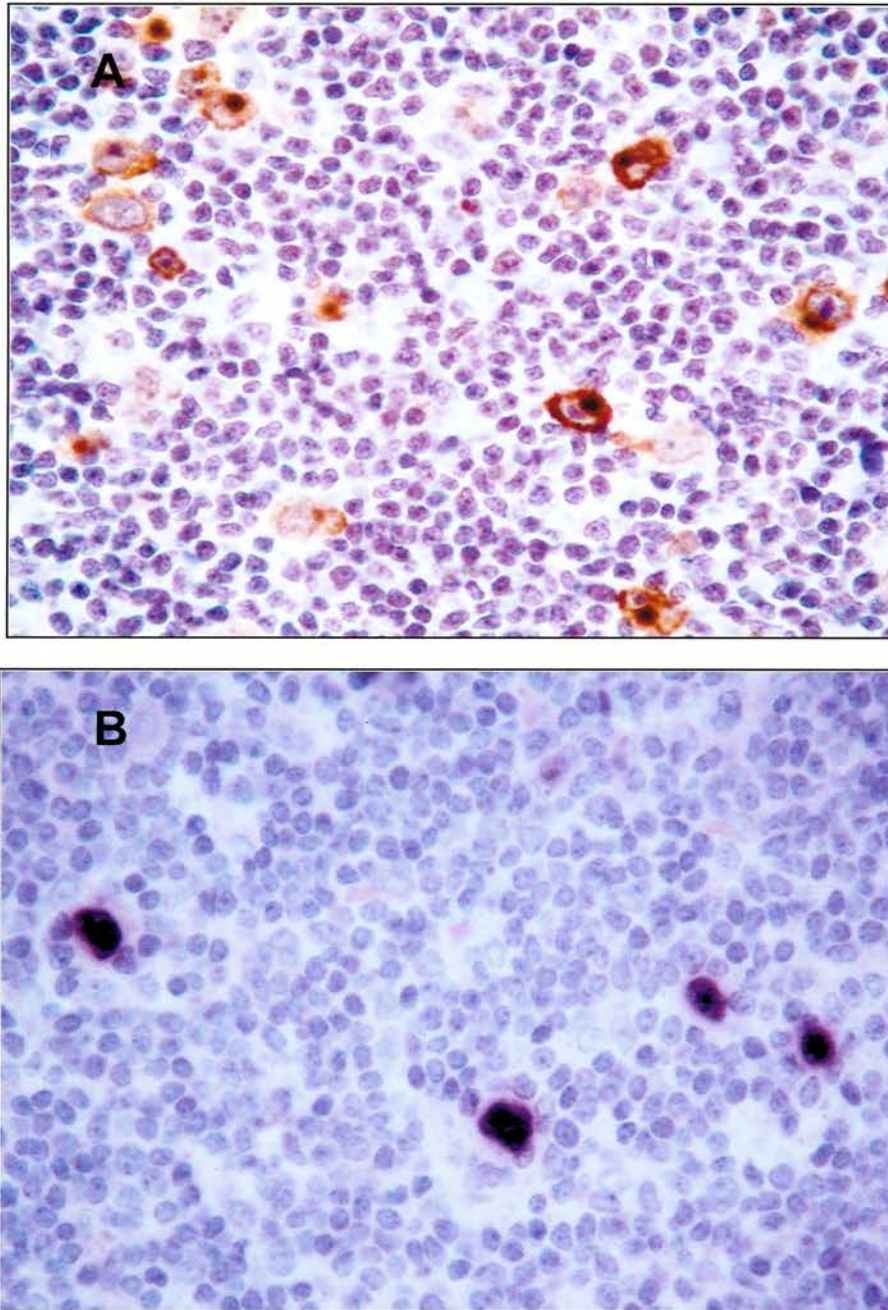


**Figura 5** - LHC. (A) IHQ - bax: CRS demonstrando marcação citoplasmática, de padrão granular. Linfócitos e macrófagos do infiltrado inflamatório também apresentam positividade. (1000x). (B) IHQ - p53: CRS apresentando padrão nuclear de marcação (400x).



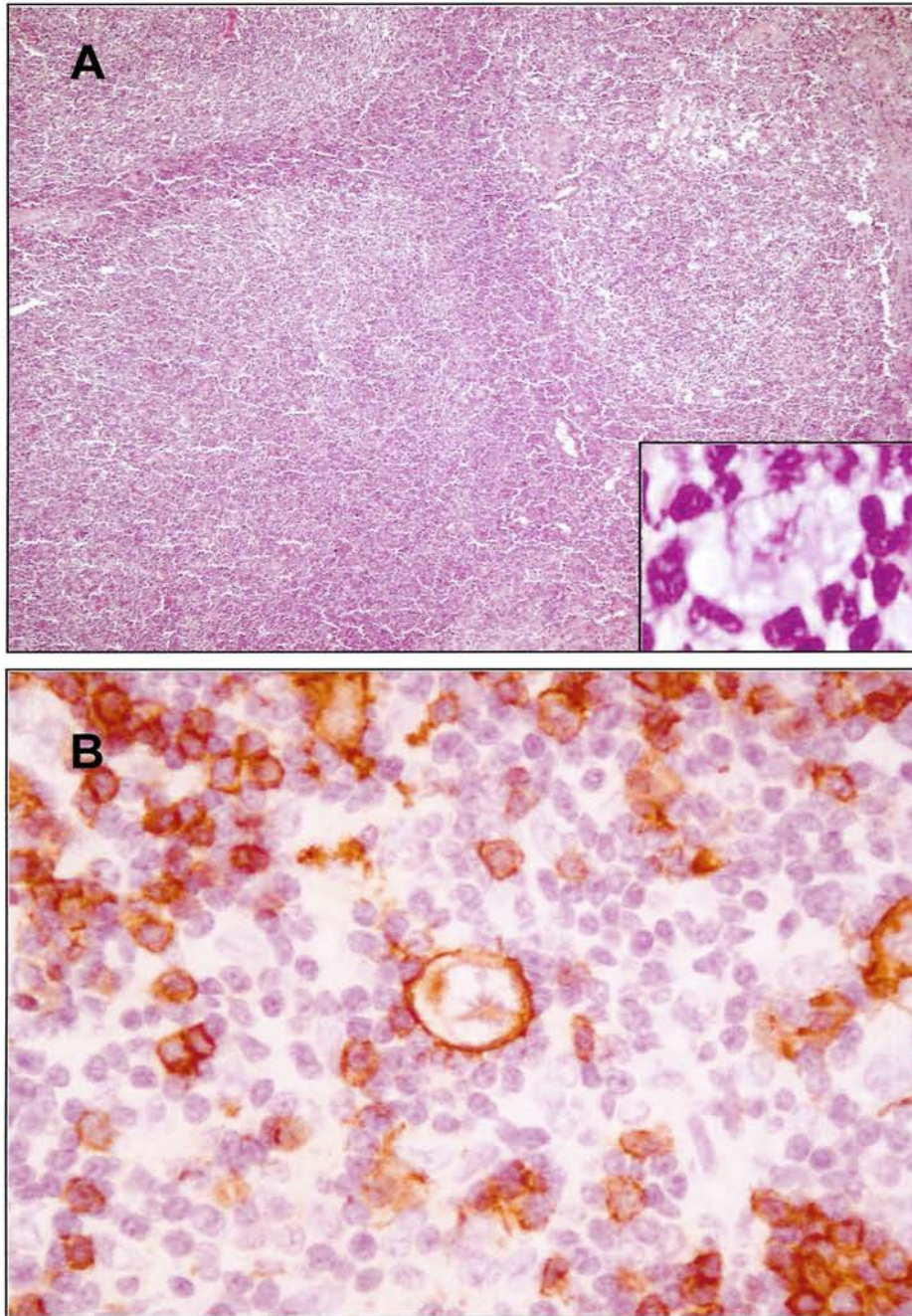


**Figura 6** - LHC. (A) IHQ - fas: CRS demonstrando forte marcação de membrana (400x). (B) IHQ - fasL: CRS apresentando padrão citoplasmático de marcação (400x).

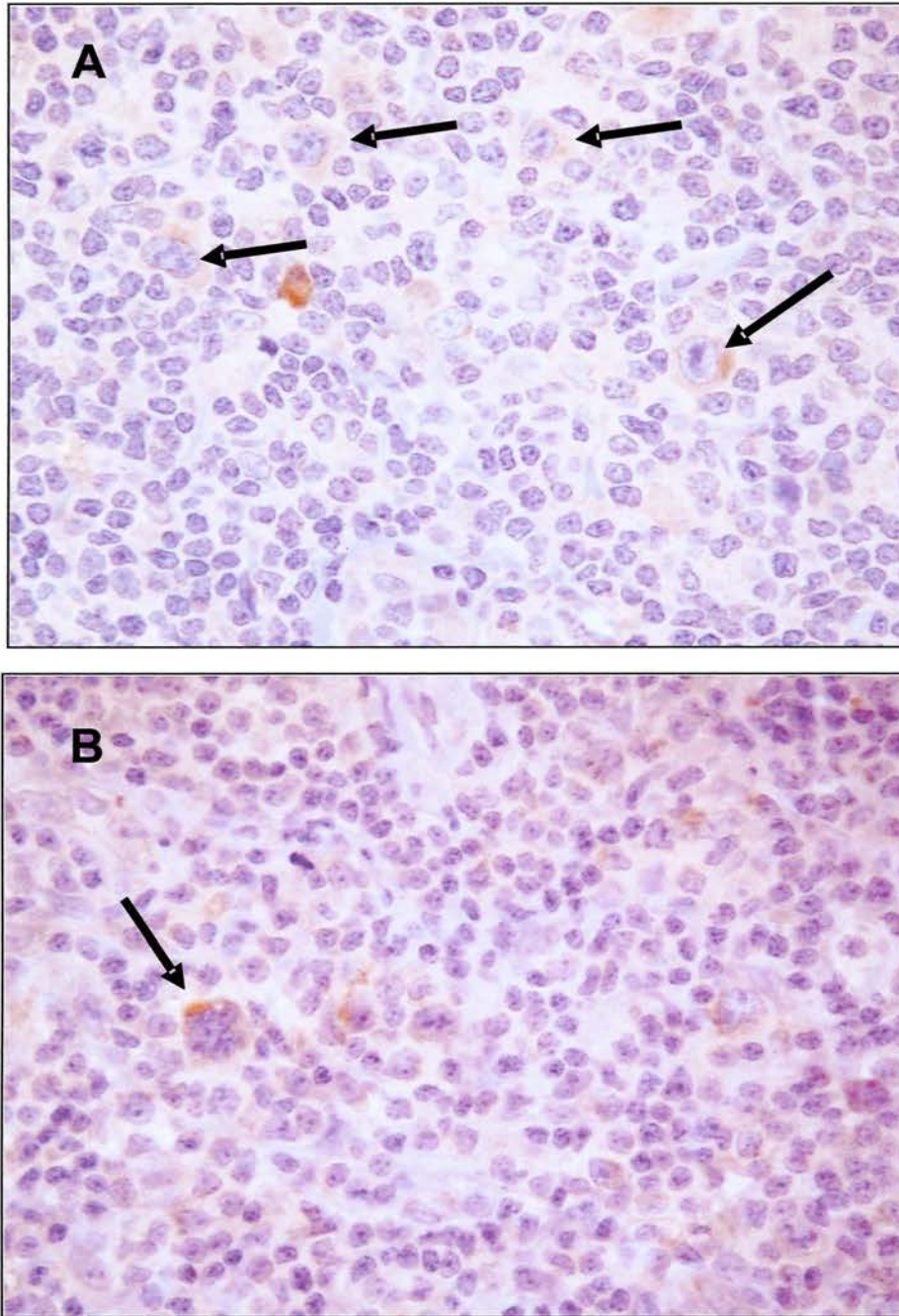


**Figura 7 - LHC.** (A) IHQ - LMP-1: CRS demonstrando marcação citoplasmática, com reforço na região do Complexo de Golgi (400x). (B) ISH - EBER: CRS apresentando padrão de nuclear de marcação (400x).



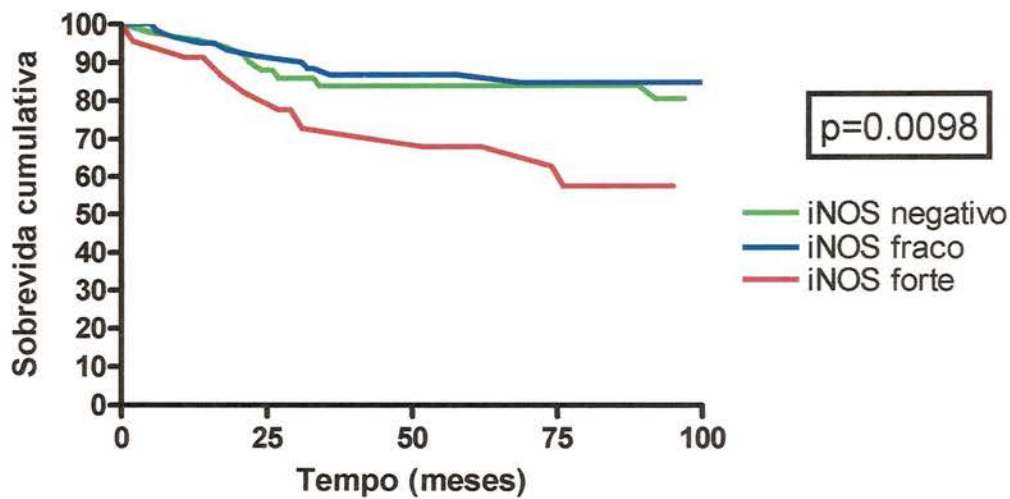


**Figura 8** - LHPLN. (A) H&E: Padrão nodular característico desta neoplasia (40x). No detalhe, célula L&H (1000x). (B) IHQ – CD20: Célula L&H apresentando padrão de marcação de membrana. Alguns linfócitos de permeio também apresentam positividade para este anticorpo (400x).

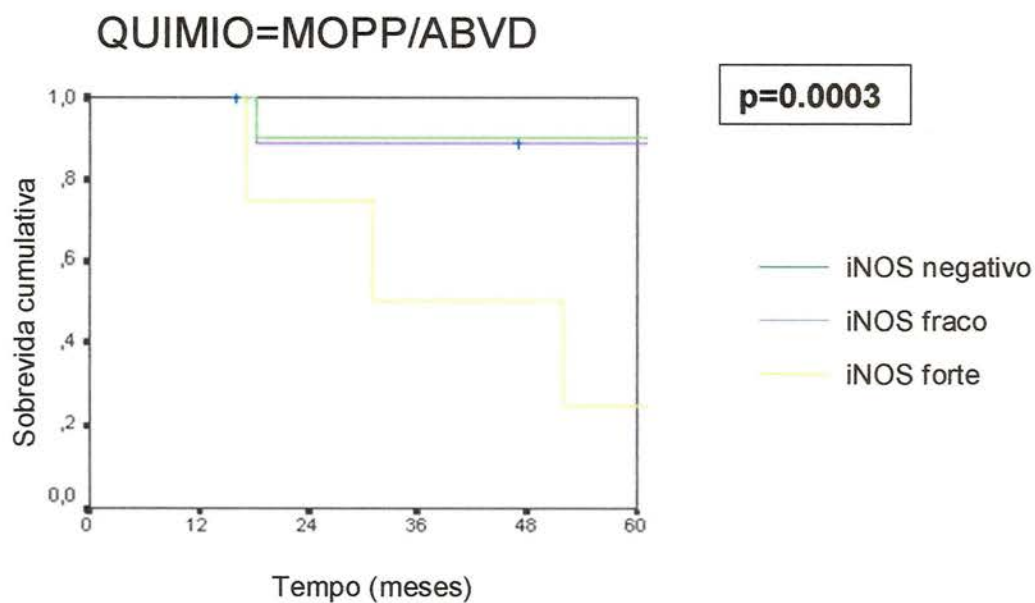


**Figura 9** - LHPLN. (A) IHQ - NOS1: Células L&H (setas) demonstrando marcação citoplasmática, com reforço na região do complexo de Golgi (400x). (B) IHQ - NOS2: Células L&H (seta) apresentando padrão de marcação citoplasmático (400x).





**Figura 10** - Curva atuarial de sobrevida global segundo a expressão de NOS2/iNOS em pacientes portadores de LHC.



**Figura 11** - Curva atuarial de sobrevida global segundo a expressão de NOS2/iNOS em pacientes portadores de LHC tratados com MOPP/ABVD.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 LINFOMA DE HODGKIN CLÁSSICO

O achado da esclerose nodular como o subtipo mais frequente de LHC no nosso estudo, seguida pelo subtipo celularidade mista, equivale ao observado em países desenvolvidos e corrobora os achados de outros autores brasileiros (VASSALO 2000), discordando, portanto, de estudos anteriores que relataram serem a celularidade mista e depleção linfocitária os tipos histológicos mais comuns em países em desenvolvimento (CORREA & O'CONNOR 1971). Tais variações podem ser devidas a diferenças na classificação do subtipo histológico, principalmente nos casos em que a fibrose é discreta e focal no linfonodo avaliado, podendo um caso ser classificado como celularidade mista e não como tipo esclerose nodular.

A probabilidade de ocorrência de sintomas B aumenta com o estágio da doença, como mostram nossos achados e dados do International Database on Hodgkin's Disease. A presença de sintomas B está incorporada na Classificação de Ann Arbor e é um fator prognóstico desfavorável estágio-independente.

A associação entre EBV e LHC em nosso estudo foi observada em aproximadamente 50% dos casos. A frequência de infecção pelo EBV associada ao LH varia com a literatura. No Brasil, a frequência chega a 82% em estudo conduzido no Ceará (ABREU et al. 1997). VASSALO (2000) reportou uma frequência de 64,5%, tanto na pesquisa de EBER quanto de LMP1. Não há trabalho na literatura que determine um fator específico como responsável pela maior ou menor frequência

de infecção pelo EBV no LH observada em alguns países ou regiões. Fatores sócio-econômicos (que podem influenciar no status do sistema imune) ou genéticos podem ser sugeridos. O achado da frequência de 82% no estudo de ABREU et al. (1997) torna excitante uma associação com fatores sócio-econômicos. GLASER et al. (1997) sugerem que efeitos da pobreza sobre o organismo podem influenciar a associação entre a infecção pelo EBV e o LHC, havendo inclusive associação ao tipo histológico (celularidade mista vs esclerose nodular). A questão, entretanto, permanece em aberto.

A forte associação observada em nosso estudo entre EBV e o sexo masculino do paciente ( $p < 0,0001$ ) encontra apoio em dados da literatura (GLASER e JARRETT 1996; MURRAY et al. 1999). Em animais experimentais, observa-se que o sexo masculino apresenta maior susceptibilidade a infecção e disseminação viral (BRULAND et al. 2001). O fato de que esteróides sexuais influenciam o desenvolvimento e função do sistema imunológico (SCHUURS e VERHEUL 1990) e que a produção de níveis de imunoglobulinas e elaboração de resposta imunológica após imunização ou infecção são maiores no sexo feminino (VERTHELYI 2001) pode explicar a menor frequência da infecção pelo EBV em mulheres com LH. Estudos adicionais são necessários para desvendar as causas subjacentes desta associação entre sexo masculino e infecção pelo EBV no LHC.

A correlação entre EBV e estádios mais avançados da doença também já foi relatada na literatura (HUH et al. 1997). O significado de tal associação é, entretanto, incerto. No nosso estudo, curiosamente, o EBV relacionou-se com estádios mais avançados da doença e com sintomas B, assim como houve correlação entre sintomas B e estágio avançado da doença. Se a produção de fatores (quimiocinas, citocinas,

anti-apoptóticos) pelas CRS EBV+ pode estar associada a uma progressão mais rápida da neoplasia é uma questão em aberto. Não encontramos trabalhos na literatura a este respeito.

A correlação entre EBV e sintomas B no LHC não é corroborada por outros trabalhos da literatura (MURRAY et al. 1999; VASSALO 2000). O estímulo pelo EBV da produção de fatores relacionados ao aparecimento dos sintomas B é uma hipótese a ser considerada para explicar a correlação observada em nosso estudo. Linfócitos B transformados pelo EBV, assim como CRS, são capazes de produzir numerosas citocinas (D'ADDARIO et al. 2001; BECK et al. 2001; WROBLEWSKI et al. 2002; OLIVIERI et al. 2003). Dentre estas, a IL-6 foi objeto de estudos que procuraram associar sua ocorrência no soro ou no tecido de pacientes portadores de LHC à ocorrência de sintomas B, com resultados conflitantes (GAUSE et al. 1991; FOSS et al. 1993; GORSCHLUTER et al. 1995).

A correlação entre EBV e o tipo histológico celularidade mista já está bem documentada em numerosos estudos (JIWA et al. 1993; KHAN et al. 1993a; VASSALO 2000; GANDHI et al. 2004).

A correlação inversa observada entre EBV e bcl-2 encontra apoio em dados da literatura (KHAN et al. 1993b; VASSALO 2000; KIM et al. 2004) e faz supor que a superregulação do gene bcl-2 pela proteína LMP-1 do EBV não ocorre no LH. Desta forma, a participação do EBV no bloqueio da apoptose observado no LHC, se efetiva, não ocorreria através deste mecanismo. Outras proteínas pró-apoptóticas podem estar envolvidas na sobrevivência das CRS em casos EBV-positivos, assim como a superregulação de bcl-2 em casos EBV-negativos pode dever-se a outros mecanismos, como a oncoproteína c-myc (CHETTY et al. 1995).



O efeito favorável no prognóstico associado à presença do EBV observado em outros estudos (MURRAY et al. 1999; VASSALO 2000) não foi confirmado por nossos achados.

A pesquisa de bcl-2 resultou positiva em 35,1% dos casos. Estudos ao longo dos últimos 10 anos mostraram positividade variando de aproximadamente 20% até 100% (JIWA et al. 1995; BRINK et al. 1998; LAURITZEN et al. 1999; VASSALO 2000; GARCÍA et al. 2003; KIM et al. 2004; MONTALBÁN et al. 2004). Tais achados podem ser devidos a variações nas técnicas imunoistoquímicas utilizadas e nos parâmetros de definição da positividade ou negatividade de um dado caso. Outros fatores devem ser considerados tais como a associação entre infecção pelo EBV em linfócitos e superregulação da proteína bcl-2. O estabelecimento desta relação causal nas CRS poderia explicar variações na expressão desta proteína. Entretanto, outros trabalhos não corroboram esta tese (JIWA et al. 1995; VASSALO 2000). Não parece haver associação entre a expressão aumentada da proteína bcl-2 e a translocação t(14;18), a exemplo dos linfomas foliculares (CORBALLY et al. 1994).

Alguns estudos relatam uma menor sobrevida global e/ou sobrevida livre de doença em pacientes portadores de LHC cujas células apresentam expressão de bcl-2 (GARCÍA et al. 2003; MONTALBÁN et al. 2004). Nosso estudo, ao contrário, não observou diferença estatisticamente significativa na sobrevida global associada à expressão de bcl-2. Ambos os estudos citados analisaram uma amostra maior de pacientes utilizando a técnica de *tissue microarray* e incluíram na amostra casos de faixa pediátrica e adulta. O anticorpo utilizado foi o mesmo do nosso estudo (clone 124, marca Dako), mas o esquema de graduação utilizado na leitura das reações foi

diferente, podendo ser responsável pela diferença na percentagem de casos positivos e sua relação com a sobrevida. Diferenças no comportamento da neoplasia associadas às características de susceptibilidade genética derivadas de diferenças regionais, étnicas e sócio-econômicas, embora difíceis de serem comprovadas, podem também ser responsáveis pelos achados discrepantes entre os estudos citados e nosso estudo. Outro estudo (RASSIDAKIS et al. 2002a) reportou um pior prognóstico associado à expressão de bcl-2 por CRS em pacientes portadores de LH tratados com o esquema quimioterápico ABVD ou regimes equivalentes. O autor não foi capaz, entretanto, de explicar o mecanismo molecular subjacente a este achado.

A proteína bax foi a primeira dos homólogos de bcl-2 a ser caracterizada como um agonista apoptótico. Bax induz apoptose ao se inserir na membrana mitocondrial, se ligando ao bcl-2 e inibindo sua função, o que leva à liberação de citocromo C (PAWLOWSKI e KRAFT 2000). Bax foi expressa em 44,4% dos casos estudados. Este achado difere do observado por VASSALO (2000), que observou positividade em 84,6% dos casos. O anticorpo utilizado foi o mesmo (clone A3533), podendo os dados discrepantes serem atribuídos a diferenças na técnica imunistoquímica e/ou ao esquema de gradação adotado para leitura das reações. Outros trabalhos utilizando diferentes clones do anticorpo bax, diferentes métodos de recuperação antigênica e métodos de leitura relatam positividade para bax nas CRS variando de 74% a 98% (GARCÍA et al. 2003; MONTALBÁN et al. 2004; KIM et al. 2004). Um trabalho demonstrou positividade para bax em apenas um de 53 casos estudados (LAURITZEN et al. 1999).

A correlação observada entre bax e p53 não encontra apoio na literatura. Entretanto, poderia ser explicada pelo fato de que a transcrição de bax e

outros genes que promovem a liberação do citocromo C pela mitocôndria pode ser iniciada por p53.

Não houve influência de bax na sobrevida global dos pacientes, ao contrário do observado por VASSALO (2000). No estudo citado, a expressão de bax tendeu a correlacionar-se com uma melhor sobrevida global, o que poderia ser explicado pela função pró-apoptótica desta proteína. RASSIDAKIS et al. (2002b) também não observou influência da expressão de bax na sobrevida em 5 anos de pacientes portadores de LH, tendo analisado vários níveis de corte para determinação de positividade (20%, 30% e 75%).

O antígeno fas foi positivo em 93,6% dos casos estudados, percentagem próxima à observada por METKAR et al. (1999), de 91%, e superior à observada por VASSALO (2000), de 61,5%. Estudos em linhagens celulares de LHC, mostrando que anticorpos agonistas de fasL não são capazes de induzir apoptose nas CRS (Re, 2000) levaram à hipótese de que mutações no gene FAS, observadas em linfomas não-Hodgkin (GRONBAEK et al. 1998; MUSCHEN et al. 2002), poderiam explicar o bloqueio desta via de ativação de apoptose no LH. Entretanto, estudos subsequentes não mostraram dados consistentes que assegurassem serem mutações no gene fas responsáveis pelo escape da apoptose observado nesta neoplasia (MUSCHEN et al. 2000; MAGGIO et al. 2003). Assim, é mais provável que a disfunção na via fas/fasL envolva defeitos em mecanismos localizados abaixo destes receptores na cascata de ativação, como c-FLIP. Têm-se demonstrado que as células de Reed-Sternberg apresentam freqüente positividade para c-FLIP (THOMAS et al. 2002), além de outros fatores participantes da via do receptor de morte (FADD), o



que faz supor que esta proteína é um participante ativo desta via no Linfoma de Hodgkin (MATHAS et al. 2004).

Em contraste ao observado na avaliação de fas, apenas 5,8% dos nossos casos mostraram positividade para fasL. Estudo de expressão gênica utilizando linhagens de CRS mostrou que estas não apresentavam transcritos de fasL (MESSINEO et al. 1998). Estes achados, entretanto contrastam com as observações de VERBECKE et al. (2001), que observaram positividade imunoistoquímica para este marcador em 87% dos casos e com as de METKAR et al. (1999), que observou positividade em 32% dos casos. De fato, a expressão forte de fasL por CRS poderia contrabalançar uma reação imune por células T circundantes.

A positividade para p53 foi observada em 44,4% dos casos. O gene p53 é um gene supressor de tumor que se encontra mutado em aproximadamente 50% de todas as neoplasias humanas. Ele codifica a proteína p53, que tem papel na parada do ciclo celular e indução de apoptose em resposta a danos provocados ao DNA. Mutações no gene p53 aumentam os níveis da proteína p53, assim como bloqueiam a transativação p53-mediada. As CRS frequentemente apresentam superexpressão de p53, levando à hipótese de que mutações no gene p53 poderiam explicar o acúmulo desta proteína e estarem envolvidas na resistência à apoptose observada nas CRS. Entretanto, dados da literatura apontam para uma baixa frequência de mutações do gene p53 no LH (ELENITIBA-JOHNSON et al. 1996; MAGGIO et al. 2001) devendo o acúmulo da proteína ser secundário a mecanismos alternativos, como por exemplo, uma diminuição nos níveis de Hdm2, proteína inibidora de p53 e que media sua ubiquitinação e degradação rápida pelo proteassomo (KUPPER et al. 2001).



Relatos na literatura de que uma expressão anormal de p53 está associada a uma menor sobrevida global de pacientes portadores de LH (BRINK et al. 1998; SMOLEWSKI et al. 2000; GARCÍA et al. 2003) não foram confirmados por nosso estudo.

Nosso estudo demonstra que as CRS frequentemente expressam NOS (particularmente NOS2, encontrada em 55% dos casos) e produzem nitrotirosina, evidência indireta da produção de ON. A expressão de NOS3/eNOS não foi avaliada neste estudo devido à inabilidade das CRS em produzirem esta enzima (MENDES 1999). A produção de ON em caso de LH já foi objeto de artigo recente que demonstrou aumento da concentração de ON no ar expirado de um paciente portador de LH (HOLMKVIST et al. 2003). Os autores observaram ainda que a concentração de ON no ar expirado diminuiu progressivamente à medida que o tratamento preconizado (8 ciclos de quimioterapia) avançava.

As correlações observadas entre as NOS e p53, membros da família bcl-2 e EBV sugerem que estas enzimas são participantes ativos do mecanismo defeituoso do programa apoptótico no LH, além de serem evidência adicional de que vias complexas de sinalização estão envolvidas neste processo.

A associação encontrada entre NOS1 e p53 sugere que a sinalização via ON poderia aumentar a transcrição e acúmulo de p53. Estudos anteriores mostraram que o dano ao DNA mediado por ON desencadeia o acúmulo de p53 e ativa a apoptose (FORRESTER et al. 1996). Foi também demonstrado que, ocorrendo o acúmulo de p53, a expressão de NOS é diminuída pela inibição do promotor de NOS (AMBS 1998b). Este mecanismo de retroalimentação negativa formado entre NO e p53 pode ser uma resposta fisiológica ao dano ao DNA mediado por ON. Em última análise, a

inibição do crescimento mediada por p53 poderia levar à mutação de p53 nas células tumorais. Isto, entretanto, não parece ocorrer no LH, no qual as mutações de p53 são eventos raros (ELENITOBA-JOHNSON et al. 1996; MAGGIO et al. 2001). É uma questão em aberto se a expressão de NOS e produção de ON podem estar envolvidas na superexpressão de MDM2, que, como já foi dito acima, é um mecanismo provavelmente envolvido no acúmulo de p53 no LH (KUPPER et al. 2001).

Observamos também uma associação entre a superexpressão de bax e de NOS2 ( $p=0.022$ ). Como já foi mencionado, o ON promove a apoptose ao diminuir os níveis de bcl-2 e aumentar os níveis de bax através do aumento da transcrição de p53. Por outro lado, a associação entre NOS2 e bcl-2 ( $p=0.034$ ) sugere que a modulação dos níveis das proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas no LH pode ser feita por outros mecanismos. O ON pode modular a clivagem e ativação de caspases, com efeitos na expressão de bcl-2 e bax. Em linfócitos B, ON previne a apoptose ao manter os níveis de mRNA e a produção da proteína bcl-2 (GENARO et al. 1995). Em hepatócitos, o ON também inibe a capacidade da caspase-3 de clivar bcl-2 (KIM et al. 1998). Considerando que a expressão de bcl-2 é inversamente correlacionada à presença de EBV e portanto parece não estar associada à infecção pelo EBV no LH, como demonstrado por nosso estudo e por outros autores (KHAN et al. 1993; JIWA et al. 1995; KIM et al. 2004), é possível que a expressão de NOS2, sendo também inversamente correlacionada à infecção pelo EBV, possa ser um dos mecanismos pelo qual a superexpressão de bcl-2 é induzida em alguns casos de LH.

Deve-se ainda ter em mente que vias de sinalização aparentemente diferentes, que levam ao bloqueio da apoptose, podem estar ligadas por uma ou mais moléculas, algumas vezes com alças de retroalimentação positiva que podem ser críticas na

habilidade da célula neoplásica em sobreviver e proliferar. NF-kappaB, que estudos têm demonstrado ser expresso pelas CRS (BARGOU et al. 1996 e1997), é um fator de transcrição que regula a expressão de vários genes envolvidos nos mecanismos de proliferação e apoptose. Genes-alvo de NF-kappaB incluem c-myc (KARIN et al. 2002) e c-FLIP (KREUZ et al. 2001; MICHEAU et al. 2001). O mecanismo que leva à superexpressão de NF-kappa B no LH não é ainda bem compreendido. No LH EBV-positivo, uma possível explicação é a ativação via LMP-1, proteína que pode mimetizar um receptor CD40 ativo e portanto ativar a transcrição de NF-kappaB (GIRES et al. 1997; KILGER et al. 1998). Por outro lado, sabe-se que o ON também pode modular a transcrição de NF-kappa B (BOGDAN 2001) e portanto estar envolvido na expressão desta molécula pelas CRS nos casos não associados à infecção pelo EBV.

Observamos ainda que a forte expressão de NOS2 pelas CRS está associada a uma menor sobrevida global. Quando estratificada por modalidade de esquema quimioterápico adotado, a forte expressão de NOS2 prediz um pior prognóstico para pacientes tratados com MOPP/ABVD. O significado biológico subjacente a esta observação não é claro e pode envolver interações entre NOS2 e ON com as demais proteínas discutidas neste estudo. Não encontramos estudos na literatura que possam fornecer subsídios para esclarecer esta questão.



## 6.2 LINFOMA DE HODGKIN PREDOMÍNIO LINFOCITÁRIO NODULAR

O presente estudo demonstrou que o LHPLN é capaz de expressar NOS, achado ainda não descrito na literatura. Não foi possível demonstrar a produção de nitrotirosina, que seria um indício indireto da produção de ON pelas células L&H.

Os resultados demonstram que a expressão de NOS2 é mais freqüente que a de NOS1 (71,4% versus 43% dos casos, respectivamente). A expressão das duas isoformas de NOS já foi observada em neoplasias de diferentes sítios e histogênese (ROSBIE et al. 1995; AMBS 1998a; WILSON et al. 1998; KLOTZ et al. 1998; SWANA et al. 1999; VAKKALA et al. 2000) havendo, entretanto, poucos trabalhos na literatura descrevendo a atividade de NOS e/ou produção de ON em neoplasias linfóides humanas (MANNICK et al. 1994; ZHAO et al. 1999; SONOKI et al. 1999; MENDES et al. 2001).

Como já descrito anteriormente, o papel das NOS e do ON na carcinogênese é variado, cobrindo desde danos ao DNA, que podem induzir ao aparecimento de mutações, até o estímulo da angiogênese e a inibição da apoptose (BRUNE et al. 1998; KIM et al. 2001; XU et al. 2002). O significado biológico da detecção de NOS nos casos de LHPLN é, entretanto, obscuro. O pequeno número de casos não permite o desenvolvimento de estudo que poderia relacionar a produção de ON com marcadores de desenvolvimento e ativação de linfócitos, e marcadores de apoptose, a exemplo do que foi realizado nos casos de LHC.

Paralelamente, a literatura acerca da biologia da célula L&H é também escassa. Estudos indicam sua derivação a partir de células B (KUPPERS et al. 1994;



OHNO et al. 1997; MARAFIOTI et al. 1997) e a existência de subclones de células tumorais derivados da ocorrência de hipermutações somáticas (MARAFIOTI et al. 1997; BRAEUNINGER et al. 1997). Entretanto, os genes e proteínas envolvidos na manutenção e progressão da neoplasia são pouco conhecidos. Há indícios de mutações no gene *fas* na sua patogênese (VAN DEN BERG et al. 2002). Expressão de *c-REL*, indicando ativação constitutiva de *NFkappaB*, foi observada em casos de LHPLN, em proporção bem inferior, entretanto, ao observado em casos de LHc (XIAO et al. 2004). Da mesma forma, a expressão de *c-FLIP* tbém foi demonstrada, em proporção menor à observada no LHc, e associada à transformação do LHPLN em Linfoma Difuso de Grandes Células em 2 casos (UHEROVA et al. 2004).

A demonstração de que as células L&H no LHPLN podem produzir *NOS1* e *NOS2* é um indício de que estas proteínas podem estar envolvidas na patogênese de neoplasias de origem hematopoiética, a exemplo do que foi observado no LHC e em outras neoplasias derivadas de células B (MENDES et al. 2001). Uma casuística mais ampla é necessária para uma melhor investigação deste achado, para investigar-se a produção ou não de ON pelas células neoplásicas, e para procurar-se correlacionar a sua presença à expressão de outros genes. Estudos de biologia molecular podem também lançar luz sobre esta questão.

## 7 CONCLUSÕES

1. As células de Hodgkin e Reed-Sternberg são capazes de expressar NOS1 e NOS2. São também capazes de produzir óxido nítrico.
2. À exceção de fasL, os demais marcadores de apoptose foram frequentemente expressos pelas CRS. A demonstração de que NOS1 e NOS2 correlacionam-se com alguns destes marcadores de apoptose é mais uma evidência de que vias complexas de sinalização estão envolvidas no processo de sobrevivência das células neoplásicas.
3. A correlação inversa observada entre LMP-1 e bcl-2 sugere mecanismos diferentes no bloqueio da apoptose em casos EBV-negativos e positivos. Dada a correlação inversa também observada entre NOS2 e EBV, é possível que NOS2 participe do mecanismo de superregulação de bcl-2 nos casos EBV-negativos.
4. Observou-se associação entre fas e sexo masculino, EBV e sexo masculino, EBV e o subtipo celularidade mista, e entre EBV e sintomas B.
5. A expressão forte de NOS2 no Linfoma de Hodgkin clássico está associada a uma menor sobrevida global, sendo ainda fator prognóstico adverso nos casos tratados com MOPP-ABVD. Não houve alteração na evolução clínica dos

pacientes estudados com relação aos demais marcadores utilizados neste estudo.

6. O Linfoma de Hodgkin do tipo Predomínio Linfocitário Nodular é capaz de expressar NOS1 e NOS2.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu ES, Ferreira FVA, Rocha Filho FD, et al. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus de Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análises morfológica, imuno-histoquímica e por hibridização in situ. **J Bras Patol** 1997; 33:178-84.

Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. **Cancer Res** 1998a; 58:334-41.

Ambs S, Ogunfusika MO, Merriam WG, Bennet WP, Billiar TR, Harris CC. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998b; 95:8823-8.

Bargou RC, Leng C, Krappmann D, et al. High Level nuclear NF- $\kappa$ B and Oct2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed Sternberg cells. **Blood** 1996, 87:4340-7.

Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. **J Clin Invest** 1997; 100:2961-9.

Beck A, Pazolt D, Grabenbauer GG, et al. Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. **J Pathol** 2001; 194:145-51.

Begnami MDFS. **Estudo da frequência da infecção pelo vírus de Epstein-Barr em adenocarcinomas gástricos, sua relação com o ciclo celular e sínteses do óxido nítrico**. São Paulo; 2003. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]



Bennett MH, MacLennan KA, Easterling MJ, Vaughan HB, Jelliffe AM, Vaughan HG. The prognostic significance of cellular subtypes in nodular sclerosing Hodgkin's disease: an analysis of 271 non-laparotomised cases (BNLI report no. 22). **Clin Radiol** 1983; 34:497-501.

Bentz BG, Simmons RL, Haines GK, Radosevich JA. The yin and yang of nitric oxide: reflections on the physiology and pathophysiology of NO. **Head Neck** 2000; 22:71-83.

Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. **Trend Mol Med** 2001; 11:66-75.

Braeuninger A, Kuppers R, Strickler JG, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin's disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:14211]. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:9337-42.

Braziel RM, Oyama K. Mistaken diagnosis of Hodgkin's disease. **Hematol Oncol Clin North Am** 1997; 11:863-92.

Brink AA, Oudejans JJ, van den Brule AJ, et al. Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: Involvement of apoptosis resistance ? **Mod Pathol** 1998; 11:376-83.

Bruland T, Dai HY, Lavik LAS, Kristiansen LI, Dalen A. Gender related differences in susceptibility, early virus dissemination and immunosuppression in mice infected with Friend murine leukaemia virus variant FIS-2. **J Gen Virol** 2001; 82:1821-7.

Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur J Pharmacol** 1998; 351:261-72.

Burke JS. Hodgkin's disease: histopathology and differential diagnosis. In: Knowles DM, editor. **Neoplastic hematopathology**. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.623-665.

Burkitt D. A sarcoma involving the jaws in African Children. **Br J Surg** 1958; 46:218-23.

Chang JF, Philips K, Lundback T, Gstaiger M, Ladbury JE, Luisi B. Oct-1 POU and octamer DNA cooperate to recognise the Bob-1 transcription activator via induced folding. **J Mol Biol** 1999, 288:941-52.

Chetty R, Bidolph S, Kaklamanis L, Giatromanolaki A, Gatter K. Relationship of EBV and bcl-2 in Hodgkin's disease. **Histopathology** 1995; 27:391-4.

Corbally N, Grogan L, Keane MM, Devaney DM, Dervan PA, Carney DN. Bcl-2 rearrangement in Hodgkin's disease and reactive lymph nodes. **Am J Clin Pathol** 1994; 101:756-60.

Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. **Int J Cancer** 1971; 8:192-201.

D'Addario M, Libermann TA, Xu J, Ahmad A, Menezes J. Epstein-Barr Virus and its glycoprotein-350 upregulate IL-6 in human B-lymphocytes via CD21, involving activation of NF-kappaB and different signaling pathways. **J Mol Biol** 2001; 308:501-14.

Delabie J, Tierens A, Gavriil T, et al. Phenotype, genotype and clonality of Reed-Sternberg cells in nodular sclerosis Hodgkin's disease: results of a single cell study. **Br J Hematol** 1996; 94:198-205

Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma-diagnosis and treatment. **Lancet Oncol** 2004; 5:19-26.

Elenitoba-Johnson KSJ, Medeiros LJ, Khorsand J, King TC. p53 expression in Reed-Sternberg cells does not correlate with gene mutations in Hodgkin's disease. **Am J Clin Pathol** 1996, 106:728-38.

Epstein MA, Achong BG, Barr YM: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **Lancet** 1964; 1:702-3.

Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature** 2001; 411:324-48.

Fischer SE. **Estudo da expressão das sintases do óxido nítrico, e proteínas associadas ao ciclo celular e apoptose, em lesões pré-malignas e carcinomas epidermóides da boca.** São Paulo; 2003 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Fonseca FP. **Detecção imuno-histoquímica das sintases do óxido nítrico (NOS neuronal, NOS induzida e NOS endotelial) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) como fatores prognósticos em portadores de adenocarcinoma localizado de próstata submetidos à prostatectomia radical retropúbica.** São Paulo; 2002 [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Forrester K, Ambs S, Lupold SE, et al. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of iNOS expression by wildtype p53. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:2442-7.

Foss HD, Herbst H, Oelmann E, et al. Lymphotoxin, tumor necrosis factor and interleukin-6 gene transcripts are present in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin's disease cases. **Br J Hematol** 1993; 84:627-35.



Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. **Br J Hematol** 2004; 125:267-81.

García JF, Camacho FI, Morente M, et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbour alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. **Blood** 2003; 101:681-9.

Gause A, Scholz R, Klein S, et al. Increased levels of circulating interleukin-6 in patients with Hodgkin's disease. **Hematol Oncol** 1991; 9:307-13.

Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. **J Clin Invest** 1995; 95:1884-90.

Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. **EMBO J** 1997; 16:6131-40.

Glaser SL, Jarrett RF. The epidemiology of Hodgkin's disease. **Baillieres Clin Haematol** 1996; 9:401-16.

Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, et al. Epstein-Barr virus associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. **Int J Cancer** 1997; 70:375-82.

Gorschluter M, Bohlen H, Hasenclever D, Diehl V, Tesch H. Serum cytokine levels correlate with clinical parameters in Hodgkin's disease. **Ann Oncol** 1995; 6:477-82.

Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. **Blood** 1998; 91:3018-24.



Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]. **Blood** 1994; 84:1361-92.

Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt tumor associated herpes-virus to infectious mononucleosis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1968; 59:94-101.

Henle G, Henle W. Epstein-Barr virus and human malignancies. **Adv Viral Oncol** 1985; 5:201.

Herbst H, Niedobitek G, Kneba M, et al. High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. **Am J Pathol** 1990; 137:13-8.

Hess JL, Bodis S, Pinkus G, Silver B, Mauch P. Histopathologic grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease. Lack of prognostic significance in 254 surgically staged patients. **Cancer** 1994; 74:708-14.

Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. **Med Chir Trans** 1832; 17:68-114.

Holmkvist T, Erlanson M, Merilainen P, Hogman M. Exhaled nitric oxide is highly increased in a case of Hodgkin's disease. **Acta Oncol** 2003; 42: 88-9.

Huh J, Park C, Juhng S, Kim CE, Poppema S, Kim C. A pathologic study of Hodgkin's disease in Korea and its association with Epstein-Barr virus infection. **Cancer** 1997; 77:949-55.

Hummel M, Ziemann K, Lammert H, et al. Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells [see comments] **N Engl J Med** 1995; 333:901-6.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. **Nature** 1997; 388:190-5.

Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. **Exp Cell Res** 1999; 248:30-43.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. Pathology & genetics. tumors of the haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research in Cancer (IARC):2001. (World Health Organization Classification of Tumors)

Jiwa NM, Kanavaros P, van der Valk P, et al. Expression of c-myc and bcl-2 oncogene products in Reed-Sternberg cells independent of presence of Epstein-Barr virus. **J Clin Pathol** 1993; 46:211-7.

Jiwa NM, Oudejans JJ, Bai MC, et al. Expression of bcl-2 protein and transcription of Epstein-Barr virus bcl-2 homologue BHRF-1 in Hodgkin's disease: implications for different pathogenic mechanisms. **Histopathology** 1995; 26:547-53.

Jon Geske F, Gerschenson LE. The biology of apoptosis. **Hum Pathol** 2001; 32:1029-38.

Kant JA, Hubbard SM, Longo DL, et al. The pathologic and clinical heterogeneity of lymphocyte depleted Hodgkin's disease. **J Clin Oncol** 1986; 4:284-94.

Kanzler H, Hansmann ML, Kapp U, et al. Molecular single cell analysis demonstrates the derivation of a peripheral blood-derived cell line (I1236) from the Hodgkin/Reed-Sternberg cells from a Hodgkin's lymphoma patient. **Blood** 1996a; 87:3429-36.

Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center cells. **J Exp Med** 1996b; 184:1495-505.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:301-310.

Khan G, Gupta RK, Coates PJ, Slavin G. Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. Relation to age and subtype. **Cancer** 1993a; 71:3124-9.

Khan G, Gupta RK, Coates PJ, Slavin G. Epstein-Barr virus infection and Bcl-2 proto-oncogene expression: separate events in the pathogenesis of Hodgkin's disease? **Am J Pathol** 1993b; 143:1270-4.

Kieff E. Epstein-barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors: **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.2343.

Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus-mediated B cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. **EMBO J** 1998; 17:1700-9.

Kim L-H, Nadarajah VS, Peh S-C, Poppema S. Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. **Histopathology** 2004; 44:257-67.

Kim PKM, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. **Int Immunopharmacol** 2001; 1:1421-41.

Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of bcl-2 cleavage and cytochrome *c* release. **J Biol Chem** 1998; 273:31437-41.

Kinney MC, Gree JP, Collins RD. Assessment of lymphocyte depleted Hodgkin's disease, reticular variant, by monoclonal antibodies reactive in paraffin sections. **Mod Pathol** 1991; 4:75A.

Klein U, Goossens T, Fischer M, et al. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. **Immunol Rev** 1998; 162:261-80.

Klotz T, Bloch W, Volberg C, Engelmann U, Addicks K. Selective expression of inducible nitric oxide synthase in human prostate carcinoma. **Cancer** 1998; 82:1897-903.

Kreuz S, Siegmund D, Scheurich P, Wajant H. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. **Mol Cell Biol** 2001; 21:3964-73.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease.** 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. Cellular adaptations, cell injury and cell death; p.31-49.

Kupper M, Joos S, von Bonin F, Daus H, et al. MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies. **Br J Hematol** 2001; 112:768-70.

Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994, 91:10962-6.

Kuppers R. Identifying the precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease: role of the germinal center B-cell lymphomagenesis. **J. Acquir Immune Defic Syndr** 1999; 21 Suppl 1:S74-9.



Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. **Blood** 1997; 90:4266-70.

Lauritzen AF, Moller PH, Nedergaard T, Guldberg P, Hou-Jensen K, Ralfkiaer E. Apoptosis-related genes and proteins in Hodgkin's disease. **APMIS** 1999; 107:636-44.

Lukes RJ, Butler JJ. The pathology and nomenclature of Hodgkin's disease. **Cancer Res** 1966; 26:1063-83.

Maciel MS. **Tumores fibroepiteliais da mama: estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína p53, isoformas das sintases do óxido nítrico, fator de crescimento do endotélio vascular, fator de crescimento plaquetário e da galectina-3.** São Paulo; 2002 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

MacLennan KA, Bennett MH, Vaughan HB, Vaughan HG. Diagnosis and grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 2190 patients. **Int Rev Exp Pathol** 1992; 33:27-51.

Maggio EM, Stekelenburg E, van den Berg A, Poppema S. TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. **Int J Cancer** 2001, 94:60-6.

Maggio EM, Van Den Berg A, de Jong D, et al. Low frequency of FAS mutations in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's lymphoma. **Am J Pathol** 2003; 162:29-35.

Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. **Cell** 1994; 79:1137-46.

Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. **N Engl J Med** 1997; 337:453-8.

Marafioti T, Hummel M, Foss HD, et al. 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** 2000; 95:1443-50.

Mason DY, Banks PM, Chan J, et al. Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity [editorial]. **Am J Surg Pathol** 1994; 18:526-30.

Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I, et al. c-Flip mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. **J Exp Med** 2004; 199:1041-52.

Mauch PM, Kalish LA, Marcus KC, et al. Long-term survival in Hodgkin's Disease. **Cancer J Sci Am** 1995; 1:33.

Mendes RCV. **Expressão das sintases do óxido nítrico em linfomas não Hodgkin e doença de Hodgkin**. Ribeirão Preto; 1999 [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo].

Mendes RV, Martins AR, de Nucci G, Murad F, Soares FA. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. **Histopathology** 2001; 39:172-8.

Messineo C, Jamerson MH, Hunter E, et al. Gene expression by single Reed-Sternberg cells: pathways of apoptosis and activation. **Blood** 1998; 7:2443-51.

Metkar SS, Naresh KN, Redkar AA, Soman CS, Advani SH, Nadkarni JJ. Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease. **Leuk Lymph** 1999; 33:521-30.

Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. **Mol Cell Biol** 2001; 21:5299-305.

Montalbán C, García JF, Abaira V, et al. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's Lymphoma: a study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. **J Clin Oncol** 2004; 22:1664-73.

Morgan D, Murray A, Hunt T, Nurse P. **Molecular biology of the cell**. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science; 2002. Cancer: the molecular basis of cancer-cell behavior; p.1007-8.

Murray PG, Billingham LJ, Hassan HT, et al. Effect of Epstein-Barr virus infection on response to chemotherapy and survival in Hodgkin's disease. **Blood** 1999; 94:442-7.

Muschen M, Re D, Brauninger A, et al. Somatic mutations of the CD95 gene in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Cancer Res** 2000; 60:5640-43.

Muschen M, Rajewsky K, Kronke M, Kuppers R. The origin of the CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. **Trends Immunol** 2002; 23:75-80.

Ohno T, Stribley JA, Wu G, Hinrichs SH, Weisenburger DD, Chan WC. Clonality in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. **N Engl J Med** 1997; 337:459-65.

Olivieri F, Bonafe M, Giovagnetti S, et al. In vitro IL-6 production by EBV-immortalized B lymphocytes from young and elderly people genotyped for -174 C/G

polymorphism in IL-6 gene: a model to study the genetic basis of inflamm-aging. **Mech Ageing Dev** 2003; 124:549-53.

Pawlowski J, Kraft AS. Bax-induced apoptotic cell death. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:529-31.

Pereira FEL. Degenerações. morte celular. alterações do interstício. In: Brasileiro Filho G, editor. **Bogliolo patologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.38-69.

Quon H, Gliedman P. Late complications after treatment of Hodgkin's disease. In: Grossbard ML, editor. **American cancer society atlas of clinical oncology. malignant lymphomas**. New York: B C Decker Inc; 2002. p.442-51.

Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, et al. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. **Blood** 2002a; 100:3935-3941.

Rassidakis GZ, Medeiros LJ, McDonnell TJ, et al. BAX expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: Correlation with clinical outcome. **Clin Cancer Res** 2002b; 8:488-93.

Re D, Muschen M, Ahmadi T, et al. Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. **Cancer Res** 2001, 61:2080-4.

Reed DM. On the pathological changes in Hodgkin's Disease, with special reference to its relation to tuberculosis. **Johns Hopkins Hosp Rep** 1902; 10:133-96.

Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets of drug discovery. **Trends Mol Med** 2001; 7:314-19.



Reedman BM, Klein G. Cellular localization of an Epstein-Barr virus (EBV) associated complement-fixing antigen in producer and non-producer lymphoblastoid cell lines. **Int J Cancer** 1973; 11:449-520.

Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1995; 113:541-9.

Ruefli AA, Smyth MJ, Johnstone RW. HMBA induces activation of a caspase independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein -mediated multidrug resistance. **Blood** 2000; 95:2378-85.

Schmid C, Sargent C, Isaacson PG. L and H cells of nodular lymphocyte predominant Hodgkin's disease show immunoglobulin light-chain restriction. **Am J Pathol** 1991; 139:1281-9.

Schuurs AHWM, Verheul HAM. Effects of gender and sex hormones on the immune response. **Steroid Biochem** 1990; 35:157-72.

Shan PC, Bertolino E, Singh H. Using altered specificity Oct-1 and Oct-2 mutants to analyze the regulation of immunoglobulin gene transcription. **EMBO J** 1997, 16:7105-17.

Smolewski P, Robak T, Krykowski E, et al. Prognostic factors in Hodgkin's disease. Multivariate analysis of 327 patients from a single institution. **Clin Cancer Res** 2000; 6:1150-60.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology** 2001; 39:179-86.

Sonoki T, Matsuzaki H, Nagasaki A, et al. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by RT-PCR in ATL patients and HTLV-1 infected cell lines: clinical features and apoptosis by NOS inhibitor. **Leukemia** 1999; 13:713-8.

Stein H, Marafioti T, Foss HD, et al. 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** 2001, 97:496-501.

Sternberg C. Uber eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukamie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. **Ztschr Heilk** 1898; 19:21-90.

Stoler MH, Nichols GE, Symbula M, Weiss LM. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease. Evidence for a kappa light-chain-restricted monotypic B-cell neoplasm. **Am J Pathol** 1995; 146:812-8.

Swana HS, Smith SD, Perrotta PL, Saito N, Wheeler MA, Weiss RM. Inducible nitric oxide synthase with transitional cell carcinoma of the bladder. **J Urol** 1999; 161:630-4.

Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, et al. Constitutive Expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells. **Am J Pathol** 2002, 160:1521-8.

Uherova P, Olson S, Thompson MA, Juskevicius R, Hamilton KS. Expression of c-FLIP in classic and nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2004; 2:105-10.

Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, Paakko P, Kinnula V, Soini Y. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2408-16.

Van den Berg A, Maggio E, Diepstra A, de Jong D, van Krieken K, Poppema S. Germline FAS gene mutations in a case of ALPS and NLP Hodgkin lymphoma. **Blood** 2002; 99:1492-4.

van Spronsen DJ, Vrints LW, Hofstra G, Crommelin MA, Coeberg JW, Breed WP. Disappearance of prognostic significance of histopathological grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease for unselected patients, 1972-92. **Br J Haematol** 1997; 96:322-7.

Vassalo J. **Expressão do vírus de Epstein-Barr e de proteínas relacionadas à apoptose em Linfomas de Hodgkin Clássicos do Adulto. Um estudo dos pacientes atendidos na Universidade Estadual de Campinas.** Campinas; 2000 [Tese de Livre Docência-Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas].

Verbecke CS, Wenthe U, Grobholz R, Zentgraf H. Fas ligand expression in Hodgkin's lymphoma. **Am J Surg Pathol** 2001; 25:388-94.

Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. **Int Immunopharmacol** 2001; 1:983-93.

Vockerodt M, Soares M, Kanzler H, et al. Detection of clonal Hodgkin and Reed-Sternberg cells with identical somatically mutated and rearranged VH genes in different biopsies in relapsed Hodgkin's disease. **Blood** 1998, 92:2899-907.

von Wasielewski R, Wilkens L, Nolte M, et al. Light-chain mRNA in lymphocyte-predominant and mixed-cellularity Hodgkin's disease. **Mod Pathol** 1996; 9:334-8.

Warnke RA, Weiss LM, Chan JKC, Cleary ML, Dorfman RF. **Tumors of the lymph nodes and spleen.** Washington (DC): Armed Forces Institute of Pathology; 1995. Classic Hodgkin's disease; p.285-8. (Atlas of tumor pathology. v.14 Third series).



Weiss L, Movahed L, Warnke R, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **N Engl J Med** 1989; 320:502-6.

Wilks S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease), with remarks. **Guy's Hosp Rep** 1865; 11:56-7.

Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. **Cancer Res** 1998; 58:2929-34.

Wolf J, Diehl V. Is Hodgkin's Disease an infectious disease ? **Ann Oncol** 1994; 5 Suppl 1:105-11.

Wroblewski JM, Copple A, Batson LP, Landers CD, Yannelli JR. Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). **J Immunol Methods** 2002; 264:19-28.

Xiao Q, Shen N, Hedvat CV, et al. Differential expression patterns of c-REL protein in classic and nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2004; 12:211-5.

Xu W, Liu L. Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize: recent progress in nitric oxide research. **Cell Res** 1998; 8:251-8.

Xu W, Liu LH, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Res** 2002; 12:311-20.

Zeng Y. Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma in China. **Adv Cancer Res** 1985; 44:121-38.



Zhao H, Dugas N, Mathiot C, et al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. **Blood** 1999; 92:1031-43.

***ANEXO***

## ANEXO A

### FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

ID:		RGH:																																	
ADMISSÃO:	IDADE:	SEXO:																																	
AP:	DATA AP:	HIV: <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> - <input type="checkbox"/> N/A																																	
TOPOGRAFIA:		ESTADIO: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> N/A																																	
<table><thead><tr><th></th><th>dir</th><th>esq</th><th></th></tr></thead><tbody><tr><td>Cervical</td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td></td></tr><tr><td>Peri-brônquica</td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td></td></tr><tr><td>Inguinal</td><td><input type="checkbox"/></td><td><input type="checkbox"/></td><td></td></tr><tr><td>Mediastino</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Fígado</td><td><input type="checkbox"/></td></tr><tr><td>Para-aórtica</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Baço</td><td><input type="checkbox"/></td></tr><tr><td>Mesentérica</td><td><input type="checkbox"/></td><td>MO</td><td><input type="checkbox"/></td></tr><tr><td>Íliaca</td><td><input type="checkbox"/></td><td>Outro</td><td><input type="checkbox"/></td></tr></tbody></table>			dir	esq		Cervical	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Peri-brônquica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Inguinal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		Mediastino	<input type="checkbox"/>	Fígado	<input type="checkbox"/>	Para-aórtica	<input type="checkbox"/>	Baço	<input type="checkbox"/>	Mesentérica	<input type="checkbox"/>	MO	<input type="checkbox"/>	Íliaca	<input type="checkbox"/>	Outro	<input type="checkbox"/>	SINT B <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	
	dir	esq																																	
Cervical	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																	
Peri-brônquica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																	
Inguinal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																																	
Mediastino	<input type="checkbox"/>	Fígado	<input type="checkbox"/>																																
Para-aórtica	<input type="checkbox"/>	Baço	<input type="checkbox"/>																																
Mesentérica	<input type="checkbox"/>	MO	<input type="checkbox"/>																																
Íliaca	<input type="checkbox"/>	Outro	<input type="checkbox"/>																																
DIAGNÓSTICO:		TRATAMENTO																																	
Esclerose nodular <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> QT _____																																	
Celularidade mista <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> RT																																	
depleção linfocitária <input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> Nenhum																																	
rico em linócitos <input type="checkbox"/>																																			
inclassificável <input type="checkbox"/>																																			
LHPLN <input type="checkbox"/>		RECAÍDA: <input type="checkbox"/> Sim. Data: _____ TTO: _____ _____ <input type="checkbox"/> Não																																	
SEGUIMENTO		IHQ																																	
Data _____		CD30 <input type="checkbox"/> CD20 <input type="checkbox"/> EMA <input type="checkbox"/>																																	
Vivo sem doença <input type="checkbox"/>		CD15 <input type="checkbox"/> CD3 <input type="checkbox"/> ALK <input type="checkbox"/>																																	
Vivo com doença <input type="checkbox"/>																																			
Óbito pela doença <input type="checkbox"/>																																			
Óbito por outra causa <input type="checkbox"/>		OBS																																	

