

CARMEM MARIA COSTA MENDONÇA

DETERMINAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFÓIDES (CD4 e CD8) EM PACIENTES COM DOENÇA DE HODGKIN

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação — Mestrado em Pediatria, para obtenção do Título de Mestre. Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Raul Corrêa Ribeiro

CURITIBA

1993



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO EM PEDIATRIA
Rua General Carneiro, 181 - 14.º Andar
80060 - Curitiba - Paraná

PARECER

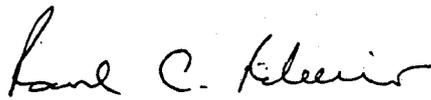
Parecer conjunto dos Professores: RAUL CORRÊA RIBEIRO, VICENTE ODONE FILHO e MIHOKO YAMAMOTO, sobre a dissertação: "DETERMINAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES LINFÓIDES (CD4 E CD8) EM PACIENTES COM DOENÇA DE HODGKIN", a nível de Mestrado em Pediatria, da aluna: CARMEM MARIA COSTA MENDONÇA, do Curso de Pós-Graduação - Mestrado em Pediatria da Universidade Federal do Paraná.

A Comissão Examinadora considerou que a Dr^a CARMEM MARIA COSTA MENDONÇA, apresentou trabalho adequado para a dissertação a nível de Mestrado em Pediatria e defendeu convenientemente as arguições que lhes foram feitas, atribuindo-lhes as seguintes notas:

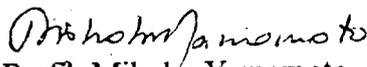
Prof. RAUL CORRÊA RIBEIRO	-	Nota (10)	e	Conceito " A "
Prof. VICENTE ODONE FILHO	-	Nota (10)	e	Conceito " A "
Prof ^a . MIHOKO YAMAMOTO	-	Nota (10)	e	Conceito " A "

Tendo a candidata sido aprovada com Média Final (10) e Conceito " A " sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná, a concessão de título de "MESTRE EM PEDIATRIA" e a publicação da dissertação em veículo de divulgação conveniente.

Curitiba, 07 de maio de 1.993


Prof. Raul Corrêa Ribeiro


Prof. Vicente Odone Filho


Prof^a. Mihoko Yamamoto

Dedico este trabalho :

A meus pais Edvaldo e Maria Carmem.

Aos meus irmãos José Antônio, José Edvaldo Jr. (in memorium) e Maria da Conceição, que mesmo estando longe, contribuíram com apoio e carinho para que este trabalho fosse realizado.

Aos amigos desta cidade, pelo grande incentivo e colaboração.

AGRADECIMENTOS:

Várias foram as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho. A todos, a autora expressa sua gratidão, e de modo especial:

Ao Prof. Dr. Raul Corrêa Ribeiro, pela orientação, apoio, amizade e estímulo.

Ao Prof. Dr. Izrail Cat, coordenador do curso de Pós-Graduação de Mestrado em Pediatria.

Aos Drs. Vicente Odone Filho, Liliam Maria Cristofani, Mara Albonei Dudeque Pianovski Kato, Flora Watanabe, Margot Ilse Hüscher, Vera Moraes, Stela Maria Pelanda, por terem gentilmente permitido a utilização, neste estudo, de dados clínicos e biológicos relativos a pacientes sob seus cuidados.

À equipe médica do serviço de Hematologia, residentes do departamento de Pediatria e Clínica Médica do Hospital de Clínicas da UFPr., pela colaboração prestada no atendimento dos doentes.

Ao Prof. Dr. Giovanni Loddo, pela colaboração na revisão histopatológica dos pacientes estudados.

Às bioquímicas do setor de Imunogenética do laboratório central do Hospital de Clínicas da UFPr, Maria Felecitas Niedfeld de Rodriguez, Noemi Farah Pereira Silmara e as farmacêuticas Mitoko Kuriki (Rosa) e em especial à Rosana Imara Cataneo, pela colaboração técnica, estímulo e amizade.

Às bioquímicas dos serviços do Inca(RJ) e Hemope(Recife), Maria do Socorro Pombo Oliveira e Aureci Araújo respectivamente, pela realização dos marcadores imunológicos, nas respectivas cidades.

À amiga Mônica Nunes Lima Cat, pelo auxílio à informática, estímulo e amizade.

Ao departamento de Informática, do Hospital de Clínicas, em especial ao Sr. Claudinei Willian C. Gazda

Às secretárias do departamento de Pediatria, em especial a Luzia dos Santos pela ajuda datilográfica, apoio e amizade.

Aos estatísticos Ari Elias Sabbag Jr. e Márcia Olandoski Ermano, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

Às bibliotecárias do Setor de Ciências da Saúde, em especial a Susana e Áurea pela orientação, apoio e amizade.

Às amigas Margot Ilse Hüsche e Teresa Cristina, pela colaboração e incentivo.

Ao casal Olavo e Mariza del Claro pela colaboração e confecção dos slides.

À Prof^ª Maria Inez de Abreu Sabatke, pelas sugestões e correção do texto.

À Associação Paranaense de Apoio a criança com Neoplasia.

SUMÁRIO

	página
Lista de Abreviaturas e Símbolos	viii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xi
Lista de Quadros	xii
Lista de Anexos.....	xiii
RESUMO.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	2
<i>1.1 Aspecto Histórico</i>	3
<i>1.2 Natureza da célula de Reed-Stenberg</i>	4
<i>1.3 Etiologia</i>	7
<i>1.4 Epidemiologia</i>	9
<i>1.5 Fatores genéticos</i>	11
<i>1.6 Classificação Histológica</i>	12
<i>1.7 Estadiamento</i>	16
<i>1.8 Tratamento e Prognóstico</i>	18
2. AS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS ASSOCIADAS A DOENÇA DE HODGKIN.....	22
OBJETIVOS	32

CASUÍSTICA.....	33
1. População de referência.....	33
2. População de estudo.....	33
2.1 Fonte.....	33
2.2 Critério de diagnóstico.....	33
2.3 Critério de exclusão.....	34
2.4 Critério de definição clínica, laboratorial e estadiamento da Doença de Hodgkin.....	34
2.4.1 Critérios clínicos.....	34
2.4.1.1 Critérios para classificação em sintomas A e B	
2.4.2 Critérios laboratoriais.....	34
2.4.3 Critérios para estadiamento.....	35
2.4.4 Critérios para divisão em gupos.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
1. Material.....	36
1.1 Equipamentos.....	36
1.2 Reagentes e soluções.....	37
2. Métodos.....	40
2.1 Colheita de material.....	40
2.2 Obtenção das células linfóides e ajuste da concentração.....	40
2.3 Preparo das placas de microtitulação.....	40
2.4 Técnica de Imunofluorescência Indireta em placas de microtitulação	41

2.5 Outros exames complementares	42
2.5.1 Contagem de células sanguíneas	42
2.5.2 Raio X de tórax e esqueleto	42
2.5.3 Ecografia abdominal.....	42
2.5.4 Tomografia computadorizada de tórax e abdômen.....	42
2.5.5 Análise histopatológica.....	42
2.6 Manifestações clínicas	43
2.7 Análise estatística	43
RESULTADOS.....	44
1. Caracterização dos casos da Doença de Hodgkin	44
2. Análise dos dados clínicos e laboratoriais.....	53
2.1 Sexo e Idade.....	53
2.2 Estadiamento clínico.....	56
2.3 Histopatologia.....	56
2.4 Achados laboratoriais	57
2.5 Linfócitos / Marcadores CD4 e CD8.....	58
3. Evolução dos pacientes estudados	61
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	71
ANEXOS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

< = menor

= = igual

> = maior

≥ = maior ou igual

Ba. = basófilo

BD = bilirrubina direta

BI = bilirrubina indireta

Bt = bastonetes

BT = bilirrubina total

CM = celularidade mista

CMV = citomegalovírus

Cr = creatinina

DH = Doença de Hodgkin

DL = depleção linfocítica

DP = desvio padrão

EBV = Vírus Epstein-Barr

EN = esclerose nodular

Eo. = eosinófilos

F = feminino

FA = fosfatase alcalina

Hb = hemoglobina

Hct = hematócrito

IL-1 = Interleucina 1

IL-2 = Interleucina 2

IL-2R = receptor de Interleucina-2

LDH = desidrogenase láctica

Leuc. = leucócito
Lt = linfócito
M = masculino
Mo. = monócito
MO = medula óssea
MUCO = mucoproteínas
N ou n = número de casos
NK = Natural Killer
PL = predominância linfocítica
Plaq. = plaqueta
Seg. = segmentado
TGO = transaminase oxacética
TGP = transaminase pirúvica
Ur = uréia
V = variação
VHS = velocidade de hemossedimentação
X = desvio médio

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
1. Distribuição dos casos segundo sexo.....	44
2. Distribuição dos casos segundo a idade.....	45
3. Divisão da idade em grupos	45
4. Principais sintomas ao diagnóstico.	46
5. Avaliação clínico laboratorial dos sinais: hepatomegalia, esplenomegalia, massa de mediastino e infiltração de MO.....	47
6. Distribuição dos casos nos estádios clínicos.	48
7. Distribuição dos casos em sintomas A e B.....	48
8. Distribuição dos casos nos subtipos histológico.	49
9. Análise do Sexo em relação ao estágio clínico e sintomas A e B	53
10. Análise da idade com sinais e sintomas.....	54
11. Análise da idade com estágio clínico	55
12. Análise da idade com o subtipo histológico.....	55
13. Análise do estágio clínico com sintomas A e B.....	56
14. Análise dos subtipos histológicos com estágio clínico.	57
15. Análise dos níveis de LDH com o estágio clínico e sintomas A e B.....	58
16. Relação entre a contagem de leucócitos e a contagem de linfócitos.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELAS	Página
1. Valores hematimétricos - dosagem de hemoglobina, número de leucócitos, plaquetas e linfócitos ao diagnóstico.....	50
2. Valores bioquímicos dos casos de doença de Hodgkin.....	51
3. Valores dos marcadores imunológicos em 26 casos estudados.	52
4. Relação do número de linfócitos com o estágio clínico e sintomas A e B...	59
5. Relação dos marcadores imunológicos com o estágio clínico e sintomas A e B.	61

LISTA DE QUADROS

QUADROS	Página
1. Proposta para a origem das células da Doença de Hodgkin.	5
2. Sistema de classificação histológica para a Doença de Hodgkin.	13
3. Sistema de estadiamento de Ann Arbor	17
4. Perfil imune de pacientes com Doença de Hodgkin.....	25
5. Componentes do sistema da imunidade celular.....	29

LISTA DE ANEXOS

ANEXOS	Página
1. Idade, sexo, duração dos sintomas (meses), sinais e sintomas ao diagnóstico, infiltração de medula óssea e avaliação por imagem.....	72
2. Valores hematimétricos encontrados nos pacientes estudados.....	74
3. Valores bioquímicos encontrados nos pacientes estudados.....	75
4. Tipo histológico, sintomas(A ou B), estadiamento clínico, número absoluto de linfócitos (mm^3) dos pacientes estudados.....	76
5. Marcadores imunológicos das células linfóides e número absoluto de linfócitos.....	77
6. Distribuição dos marcadores imunológicos e número de linfócitos nos estádios clínicos.	78
7. Distribuição dos marcadores imunológicos em relação aos sintomas A e B.	79
8. Ficha de coleta dos dados dos pacientes com Doença de Hodgkin.	80

RESUMO

Anormalidades Imunológicas que tem sido descritas em associação com a Doença de Hodgkin são traduzidas por uma imunidade celular alterada. O mecanismo responsável por estas anormalidades não foi completamente elucidado. Com o objetivo de verificar se as alterações imunológicas estão associadas a fatores de mau prognóstico na Doença de Hodgkin em crianças, nós estudamos 31 pacientes abaixo de 22 anos; em 26 foram estudados os indicadores imunológicos CD4 e CD8, utilizando anticorpos monoclonais pela técnica de imunofluorescência indireta. A idade dos pacientes variou de 3 a 22 anos($11 \pm 1.04a$), sendo 20/31(64,5%) menores de 13 anos. Vinte pacientes(71%) eram do sexo masculino e 9(29%) do sexo feminino. A duração dos sintomas ao diagnóstico variou de 1 a 24 meses(média=6,5meses). Linfonomegalia (cervical e/ou inguinal) foi o sintoma mais freqüente encontrado em 24/31 pacientes(77.4%), seguidos de perda de peso em 10 pacientes(32.3%), febre em 8(25.9%), astenia em 6(19.4%) e sudorese noturna em 2(6.5%). Dezoito pacientes(58%) pertenciam ao estágio I/II e 13(42%) ao estágio III/IV, 19(61.3%) tinham sintomas A e 12(38.7%) sintomas B. Na análise histopatológica, observaram-se 22(71%) casos com tipo histológico celularidade mista, 4(13%) esclerose nodular, 3(10%) predominância linfocítica e 2(6%) depleção linfocítica. A linfonomegalia periférica, doença localizada e o tipo histológico celularidade mista foram significativamente associados a crianças menores de 13 anos, enquanto massa de mediastino a pacientes acima dessa idade. Houve associação entre linfopenia periférica e os estádios avançados da doença e sintomas B, porém a relação dos marcadores imunológicos CD4+ e CD8+ apresentaram resultados dentro dos limites da normalidade. Esses dados não esclarecem se a deficiência imunológica é decorrente da alteração de subpopulações celulares, ou da secreção de substâncias como linfocinas ou outras moléculas, mas sugerem que outros mecanismos imunológicos, ou não, possam estar envolvidos na fisiopatogenia da Doença Hodgkin.

INTRODUÇÃO

Embora a taxa de cura das crianças com Doença de Hodgkin, tratadas com protocolos modernos, aumentou significativamente nos últimos 20 anos^{56,91}, muitos problemas importantes ainda existem em relação ao manejo dos pacientes pediátricos com essa doença. Por exemplo, o acompanhamento ao longo dos anos, das crianças que foram curadas com o uso de radioterapia e/ou quimioterapia, revelou que muitas delas desenvolvem seqüelas debilitantes, decorrentes do tratamento¹²⁴. A morbidade dos efeitos do tratamento pode ser ainda mais importante em pacientes de regiões geográficas, como a do continente Sul Americano, em que a doença incide em grupos etários mais jovens⁴³ e com maior susceptibilidade para o desenvolvimento de seqüelas decorrentes de tratamento do que os adultos⁵⁶.

Portanto, existe a necessidade de determinar fatores que permitam prever a resposta terapêutica e o desenvolvimento de efeitos deletérios tardios, nesse grupo de pacientes. O estabelecimento desses fatores prognósticos permitiria a elaboração de programas de tratamento específicos, para determinadas categorias de pacientes, com a intenção de manter o alto grau de eficácia conseguida pelos programas de tratamento modernos, e ao mesmo tempo reduzir a probabilidade de desenvolvimento de efeitos colaterais.

Relevante a essa estratégia, é o estudo da relação entre o estado imunológico do paciente com os indicadores de mau prognóstico, tais como estágio avançado da doença e manifestações sistêmicas adversas (febre prolongada e perda de peso)^{16,17,96,184,199,202}. É possível que as crianças de países em desenvolvimento adquiram a doença em uma idade mais precoce e, rapidamente, progrida para um estado mais avançado, devido a alterações imunológicas decorrentes de infecções específicas, adquiridas durante os primeiros anos de vida.

Como estão amplamente documentadas na síndrome de imunodeficiência adquirida, profundas alterações imunológicas ocorrem antes do aparecimento das neoplasias, que freqüentemente complicam essa síndrome¹⁸¹. Com o objetivo de verificar a hipótese de que alterações imunológicas, semelhantes àquelas que ocorrem na síndrome de imunodeficiência, estão associadas com fatores de mau prognóstico na Doença de Hodgkin da criança, nós estudamos indicadores imunológicos em 26 pacientes com Doença de Hodgkin.

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Doença de Hodgkin é uma neoplasia do sistema linforeticular com características clínicas e histológicas próprias, acometendo grupos etários variáveis. Nos Estados Unidos, a Doença de Hodgkin tem uma taxa de ocorrência de 5.8 por milhão em crianças brancas, e em 6.1 por milhão em crianças negras⁷⁵. Nas regiões do mediterrâneo e da América do Sul, essa taxa de ocorrência é aparentemente maior, embora não esteja ainda definida a sua ordem de magnitude.

Embora relativamente infreqüente, essa neoplasia tem despertado enorme interesse, em parte, pela diferença de manifestações clínicas e biológicas que a doença exibe, dependendo das regiões geográficas aonde ela é diagnosticada^{6,8,46,60,85,86,113,134,164,177,183}, e em parte, pela possível associação etiopatogênica com agentes infecciosos comuns^{84,169,194,196}.

Após muitos anos de investigação, a origem da célula característica da Doença de Hodgkin e a natureza das anormalidades imunológicas do hospedeiro com essa doença, não foram ainda completamente definidas. Contudo, estudos recentes estão possibilitando uma maior compreensão da patogenia e etiologia da Doença de Hodgkin, que uma vez esclarecidas, poderão mudar significativamente a forma como

esses pacientes são tratados.

1.1 ASPECTO HISTÓRICO

A entidade clínica que hoje conhecemos como Doença de Hodgkin foi reportada pela primeira vez em 1832, por Thomas Hodgkin, que acreditava ter descrito uma doença nova (citado por Kaplan¹⁰⁴). Entretanto, a doença descrita por Hodgkin já era conhecida pelo menos há três séculos. Essa foi também uma das primeiras doenças neoplásicas a ser estudada com técnicas de anatomia patológica, e de ser curada com radioterapia⁷² e subsequente com combinação de agentes quimioterápicos, nos casos de estádios mais avançados^{30,110,117,156}.

Por muito tempo, a Doença de Hodgkin foi considerada uma forma peculiar de tuberculose ou mesmo uma doença de natureza inflamatória, devido à sua apresentação clínica de curso febril variável, com aumento e diminuição dos gânglios linfáticos e com freqüente coexistência de tuberculose ou outras doenças infecciosas. nos achados de autópsia¹⁰⁴.

Os aspectos histológicos da Doença de Hodgkin foram primeiramente descritos por C. Sternberg, em 1898, e posteriormente detalhados por Dorothy Reed em 1902 (citado por Kaplan¹⁰⁴). Ambos acreditavam que o processo pudesse ser de natureza infecciosa: Sternberg propôs tuberculose; Reed algum agente infeccioso não identificado, ou mesmo uma doença de natureza inflamatória, pois macroscopicamente, seu crescimento difere de um tumor maligno em ausência de infiltração capsular e envolvimento de tecidos adjacentes. Durante o século XX, o conhecimento sobre o defeito da resposta imune que ocorre, freqüentemente, em pacientes com Doença de Hodgkin^{4,19,27,52,61,89,94,114,130,158,159,171,174,189,190}, fez com que novas propostas surgissem para explicar a etiologia da doença, como por exemplo,

sendo parte de uma desordem imunológica crônica. Certas similaridades histológicas, vistas em reações imunológicas tipo enxerto-versus-hospedeiro, levou Kaplan e Smithers¹⁰³ a sugerir que a Doença de Hodgkin pudesse representar um processo auto-imune, envolvendo a interação entre células linfóides normais e neoplásicas. Esta hipótese foi também desenvolvida por outros autores^{49,137}.

A evidência definitiva de que a Doença de Hodgkin fosse realmente uma neoplasia maligna, porém atípica, emergiu nos últimos 20 anos como consequência de estudos citogenéticos¹⁸⁵ e de cultura celular^{102,188}, os quais têm demonstrado que as células consideradas indispensáveis para esse diagnóstico, satisfazem os dois critérios fundamentais maiores de neoplasia que são: aneuploidia e derivação clonal¹⁵⁵.

1.2 NATUREZA DA CÉLULA DE REED-STENBERG

O compartimento celular do qual se originam as células tumorais da Doença de Hodgkin não está completamente definido. Ao longo dos anos, essas células tumorais têm sido consideradas como derivadas de linfoblastos, linfócitos B ou T, monócitos, células mielóides, células endoteliais dos sinusóides dos linfonodos, histiócitos, megacariócitos, células foliculares dendríticas, interdigitantes ou células precursoras hematopoéticas (Quadro 1)⁵³.

Em contraste com a maioria das neoplasias do sistema hematopoético, cujas células neoplásicas estão bem caracterizadas, tanto do ponto de vista imunofenotípico quanto genotípico, existem poucas informações a respeito da natureza da célula de Reed-Sternbeg. Muitos fatores são responsáveis pelas dificuldades encontradas na caracterização das células consideradas neoplásicas, na Doença de Hodgkin. Primeiramente, o índice de proliferação do tumor é muito baixo, existindo apenas um

QUADRO 1. PROPOSTAS PARA A ORIGEM DA CÉLULA DA DOENÇA DE HODGKIN

TIPO CELULAR	REFERÊNCIA
ORIGEM LINFÓIDE	
• Linfoblasto	Mallory (1914)
• Subpopulação T ativada	
cel. T	Order (1972), Biniaminow (1974)
cel. B	Leech (1973), Garuin (1974)
• Cel. linfóide (T ou B)	Stein (1984,1985)
• Precursor linfóide imaturo	Falk (1987), Kamesaki (1989), Athar (1989), Herbst (1989)
ORIGEM MIELOMONOCÍTICA	
• Cel. monocítica	Mcjunkin (1928)
• Mieloblasto, cel. precursora mielóide	Lewis (1941), Stein (1982)
• Cel. precursora mielomonocítica	Diehl (1982)
OUTRAS ORIGENS	
• Cel. seio endoteliais	Reed (1902)
• Megacariócitos	Medlar (1931)
• Histiócito	Bessis (1948), Rappaport (1966), Mori (1969), Kaplan (1977), Kadin (1978)
• Cel. dendríticas foliculares	Curran (1978)
• Cel. dendríticas ("STEINMANN")	Fischer (1983, 1985)
cel. apresentadora de antígeno	
• Cel. interdigitantes	Hansmann (1981),Kadin (1982), Hsu (1985)
• Cel. precursora pluripotente	Falk (1983)

número pequeno de células em divisão celular, o que limita sobremaneira o estudo citogenético dessas células. Segundo, o pequeno número das células tumorais que é diluído por um grande infiltrado de células linfóides reacionais normais, interfere com a caracterização imunofenotípica. Finalmente, as culturas das células neoplásicas da Doença de Hodgkin têm sido particularmente difíceis de serem obtidas. Devido à maioria dessas linhagens celulares ter sido estabelecida após uma série de manobras artificiais, existe muita dúvida sobre a natureza das células crescendo em culturas.

Com essas limitações consideradas, os estudos empregando técnicas imunológicas sugerem que as células tumorais da Doença de Hodgkin são de origem linfóide^{59,131,136,137}. As investigações mais recentes têm sido congruentes nesse ponto. As células de Reed-Sternberg e suas variantes (chamadas de células de Hodgkin) reagem com uma série de anticorpos que são produzidos a partir de células linfóides. A questão se as células de Reed-Sternberg e de Hodgkin são derivadas dos linfócitos T ou B não está completamente resolvida. Enquanto que a totalidade das linhagens celulares estudadas reagem positivamente ou com marcadores de células T (CD2, CD3, CD4, CD5 e CD7) ou com de células B (CD19, CD20, e CD21), apenas 11% (T) e 15% (B) dos casos são positivos quando a técnica de coloração utiliza material preparado a partir de blocos de parafina, processados por fixação convencional. Outras técnicas aprimoradas, que utilizam material tumoral embebido em plástico, aumentam a percentagem de casos reagindo positivamente com marcadores de linfócitos T (60%) ou B (20%)^{1,34,53}.

Alguns estudos têm indicado que existe associação entre o imunofenótipo da Doença de Hodgkin e o tipo histológico. Os tipos histológicos esclerose nodular e celularidade mista estão associados com uma proporção aumentada de casos com marcadores de células T^{1,35}, enquanto que o tipo predominância linfocítica está definitivamente associado aos marcadores de células B¹. A importância clínica ou

prognóstica do estudo imunofenotípico não está claramente definida, a não ser pela possibilidade de facilitar a separação do tipo predominância linfocítica dos outros subgrupos.

A interpretação dos estudos citogenéticos na Doença de Hodgkin apresenta as mesmas limitações impostas àquela dos estudos imunofenotípicos. Embora muitas alterações cromossômicas numéricas e estruturais foram descritas, não existe um marcador citogenético específico dessa doença. Entre as alterações cariotípicas freqüentemente encontradas, aneuploidia com hiperdiploidia é a mais comum¹⁸⁸. Rearranjos de cromossomos tais como translocações e deleções são encontrados em mais da metade dos casos^{186,143}. Alguns dos pontos de quebras dos cromossomos envolvidos nos rearranjos genéticos foram descritos em neoplasias do sistema linfóide²⁹.

1.3 ETIOLOGIA

Após muitos anos de investigação dos possíveis fatores causais da Doença de Hodgkin, a sua etiologia permanece elusiva. Baseados em características epidemiológicas, que em muitos aspectos são similares à da poliomielite epidêmica antes da descoberta da vacina, alguns autores postularam uma etiologia viral para a Doença de Hodgkin. O papel do vírus Epstein-Barr (EBV) como agente necessário para desencadear ou facilitar a Doença de Hodgkin tem sido proposto por vários investigadores^{39,51,84,86,132,169,171}. Suporte para esta hipótese vieram dos estudos realizados no início dos anos 70, que demonstraram uma associação entre a presença de anticorpos para o vírus de Epstein-Baar e a Doença de Hodgkin¹¹⁴. Altos títulos de anticorpos contra o antígeno capsídio e o antígeno precoce do Epstein-Baar foram descritos em associação com casos da Doença de Hodgkin ativa. Esses achados são compatíveis tanto a uma infecção aguda pelo Epstein-Baar, a uma reativação, ou a

uma infecção previa por esse vírus^{5,111,114}. Subsequentemente, foi observado que existia um risco consistentemente aumentado de adquirir a Doença de Hodgkin em indivíduos que desenvolveram mononucleose infecciosa; e finalmente, do aumento dos títulos de anticorpos para o vírus, antecedendo em muitos anos o aparecimento da doença¹³².

Tentativas iniciais em demonstrar ácido nucléicos (DNA), específicos do vírus Epstein-Baar, não foram bem sucedidas, e a associação entre este vírus e a Doença de Hodgkin ficou por muitos anos como sendo apenas de caráter indireto. Com o avanço nos métodos de investigação molecular, foi possível examinar com maior precisão a relação entre a presença do material genético viral e a Doença de Hodgkin. Estudos usando sondas do vírus de Epstein-Baar, pela técnica de hibridização, demonstraram a presença do genoma do vírus em 15% a 20% dos casos de Doença de Hodgkin, em adultos da América do Norte, Europa e Japão. Weiss e cols.²⁰⁰ identificaram o DNA do vírus do Epstein-Barr em tecido de 20% dos pacientes com Doença de Hodgkin, e enquanto Brousset e cols.²⁶ detectaram RNA mensageiro do Epstein-Baar nas células obtidas por biópsias dos linfonodos em 16 dentre 54 (30%) casos afetados pela neoplasia. Nesse último estudo, os autores não observaram correlação entre marcadores sorológicos do vírus Epstein-Barr (anticorpos contra o antígeno capsídio viral e contra o antígeno precoce) e a expressão do RNAm viral. Essa metodologia também indicou que a proliferação das células que continham o vírus era de natureza monoclonal, sugerindo um papel patogénico do vírus no processo da transformação maligna.

Mais recentemente, a demonstração da expressão genética do vírus de Epstein-Baar nas células de Reed-Stenberg corroborou a impressão de que o vírus não é meramente um contamine inocente dessas células⁹². Estudos semelhantes em crianças são raros, devido ao pequeno número de casos disponíveis. Em um estudo

com um pequeno número de casos, Ambider e cols.⁵ verificaram que, em um grupo de 11 crianças com Doença de Hodgkin, de Honduras, em todos foi encontrado o genoma do vírus Epstein-Barr em material histológico do tumor, enquanto que apenas em apenas 9 dos 25 casos provenientes dos Estados Unidos, apresentavam o genoma do vírus em material histopatológico. Houve uma associação importante entre a presença de genoma do vírus e o tipo histológico celularidade mista independentemente. Em outro estudo, Jarret e cols.¹⁰¹ demonstraram, pela técnica de "Southern Blot", que 71% dos casos com idade superior a 50 anos, 54% com idade inferior a 14 anos, e apenas 15% com idade entre 15 a 34 anos, possuíam evidência do genoma do vírus na material tumoral biopsiado.

Estes estudos sugerem que o vírus Epstein-Baar é importante para a patogênese dessa doença, mas que fatores regulatórios de natureza imunológica poderiam participar na expressão fenotípica da doença. A esse respeito, Boyle e cols.²⁴ verificaram associação entre a infecção pelo vírus Epstein-Baar do tipo B e casos com Doença de Hodgkin que possuíam disfunção imune pré-existente. Em contraste, casos com Doença de Hodgkin sem história prévia de deficiência imunológica, possuíam o genoma vírus Epstein-Baar do tipo A no material histopatológico.

1.4 EPIDEMIOLOGIA

De um modo geral, a Doença de Hodgkin é caracterizada por uma curva de incidência bimodal em relação à idade. Para explicar esta bimodalidade, Mac Mahon¹²⁰ propôs a hipótese de dupla etiologia, baseado nos diferentes padrões histológicos encontrados entre pacientes jovens e aqueles com idade mais avançada. Nos primeiros, a doença seria causada por um agente biológico de baixa infectividade e, nos segundos, um processo maligno espontâneo de causas similares a outros linfomas.

Foi também notado que em regiões poucos desenvolvidas, como o leste da África^{60,113}, Peru¹⁷⁷, Colômbia⁴³, Índia⁴⁶ e Brasil⁶, existe um pico de incidência em crianças abaixo de 14 anos. Essa associação entre uma incidência aumentada em crianças e as condições sócio-econômicas levou a alguns investigadores a postularem que famílias numerosas, com baixo grau de educação e higiene, favorecem a exposição precoce das crianças ao possível agente transmissor da doença, e com isso o aumento da incidência desta patologia nessa faixa etária^{84,86,88,196}. Além da idade ao diagnóstico, outro aspecto que difere nas várias regiões geográficas é a frequência relativa das diferentes categorias histopatológicas. Em muitos estudos, foi relatado o predomínio do subtipo histológico esclerose nodular nos países desenvolvidos, como Estados Unidos e Europa, enquanto os subtipos celularidade mista e depleção linfocítica são mais predominantes nos países subdesenvolvidos^{6,43,46,60,113,177}.

Correa e Conner⁴³ foram os primeiros a descrever as características epidemiológicas da Doença de Hodgkin em crianças. Nesse estudo, eles agruparam os pacientes em 3 grupos distintos. O tipo I consiste de uma predominância de meninos que se apresentam com a doença clinicamente avançada. O primeiro pico de incidência neste grupo ocorre entre 4 e 6 anos de idade e o segundo entre 28 e 30 anos de idade. Outra particularidade deste grupo é de que a maioria das crianças possui tumores com tipos histológicos reconhecidamente associados a um pior prognóstico (i.e. celularidade mista ou depleção linfocitária). Crianças com Doença de Hodgkin do tipo I são frequentemente diagnosticadas em países em desenvolvimento, tais como Brasil, Colômbia, Turquia, Índia, África e outros de condições sócio-econômicas semelhantes. Pacientes com o tipo epidemiológico III predominam em países industrializados e bem urbanizados. A maioria dos pacientes deste grupo é representado por adultos jovens com tumoração localizada no mediastino ou região cervical, com histologia considerada de melhor prognóstico (i.e. esclerose nodular). Nessas populações, tipificadas por aquelas do noroeste dos Estados Unidos e países

do oeste da Europa, a Doença de Hodgkin é raramente diagnosticada antes dos 10 anos de idade. A partir dessa idade, existe um aumento progressivo da incidência com um pico em torno dos 20 anos e um declínio aos 45 anos. Após os 45 anos de idade, é notado novamente um aumento progressivo da incidência da Doença de Hodgkin, porém com predomínio do tipo histológico celularidade mista e apresentações clínicas caracterizadas por estádios mais avançados da doença⁴³. Nas regiões rurais dos Estados Unidos e países menos desenvolvidos da Europa central, observa-se um padrão de apresentação clínica que é intermediário, denominado de tipo II, que não possui um perfil epidemiológico típico e consiste de uma combinação dos dois tipos discutidos anteriormente.

1.5 FATORES GENÉTICOS

Há evidências do aumento da incidência da Doença de Hodgkin entre os membros de famílias consangüíneas^{15,82,195} e entre membros de famílias em que um dos indivíduos dessa família foi diagnosticado com a doença. Gufferman e cols.⁸¹ sugeriram que o risco em desenvolver a doença é sete vezes maior entre irmãos do mesmo sexo e duas vezes maior entre irmãos do sexo oposto, quando comparados com a população em geral.

Essa maior susceptibilidade de membros de uma mesma família pode refletir anormalidades genéticas ou ambientais. Björkholm e cols.¹² estudaram parâmetros da função imunológica de irmãos de pacientes que tinham falecido pela Doença de Hodgkin e concluíram que, embora o número de células T e B estivessem normais, todos mostravam deficiência na função das células T, sugerindo que a deficiência imunológica é importante na patogênese da doença. Esses estudos, contudo, não esclarecem se os membros dessas famílias são afetados por doenças infecciosas com potencial para produzir anormalidades imunológicas, ou se eles herdaram alterações

genéticas comuns, que predisõem ao desenvolvimento das alterações imunológicas que favorecem ao aparecimento da Doença de Hodgkin.

Estudos orientados para estabelecer uma possível associação entre os antígenos de histocompatibilidade humana (HLA) com a Doença de Hodgkin^{23,98,146}, indicaram que existe uma maior ocorrência dos antígenos HLA A1, B5, e B18 em pacientes com Doença de Hodgkin, contudo, o papel da hereditariedade como fator predisponente da Doença Hodgkin permanece indefinido.

1.6 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

O diagnóstico definido da Doença de Hodgkin é baseado no exame histopatológico dos cortes de linfonodos envolvidos, corados pela técnica da hematoxilina-eosina. O diagnóstico morfológico baseia-se no achado da célula de Reed-Stenberg (RS) em meio a um infiltrado celular misto. O diagnóstico morfológico poderá ser realizado apenas quando a célula característica da Doença de Hodgkin é observada em conjunto com as outras alterações celulares dos linfonodos. A natureza heterogênea desse infiltrado contém menos de 1% das células consideradas como sendo neoplásicas, o que muitas vezes dificulta sobremaneira o diagnóstico. Vários sistemas de classificação histológica para a Doença de Hodgkin foram propostos (quadro 2.)⁹, sendo o mais utilizado o proposto na conferência de Rye¹⁵⁴ em 1966, que classifica em quatro subtipos histológicos: predominância linfocítica, esclerose nodular, celularidade mista e depleção linfocítica.

QUADRO 2. SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA PARA DOENÇA DE HODGKIN

JACKSON PARKER 1974	LUKES- BUTLER HICKS 1966	CLASSIFICAÇÃO RYE LUKES E COLS 1966	POPPEMA-LENNERT KAISERNILG 1979
Paragranuloma	Linfócito e/ou Histiócito Nodular Difuso	Predominância Linfocítica	Paragranuloma difuso Paragranuloma Nodular Predominância linfocítica, outros
Granuloma	Esclerose nodular Misto Fibrose difusa	Esclerose nodular Celularidade mista	Esclerose nodular Celularidade mista
Sarcoma	Reticular	Depleção linfocítica	Depleção linfocítica

A distinção desses subgrupos é baseada muito mais na proporção dos diferentes componentes celulares dos linfonodos, do que no número das células de Reed-Stenberg. Excluindo a forma histológica esclerose nodular, existe uma relação inversa entre a intensidade do infiltrado linfocitário e o número de células de Reed-Stenberg, na medida em que o tipo histológico é classificado de predominância linfocitária para o de depleção linfocitária. Muito embora a célula de Reed-Stenberg seja um pré-requisito necessário, o seu achado não é suficiente para estabelecer esse diagnóstico, desde que em algumas outras situações clínicas (por exemplo, na mononucleose infecciosa), a célula de Reed-Stenberg poderá estar presente nos linfonodos. A Doença de Hodgkin é raramente diagnosticada na ausência de células mononucleares de Hodgkin ou células polinucleadas de Reed-Stenberg.

O tipo histológico chamado de predominância linfocitária ocorre em aproximadamente 5% dos casos. Lukes e Butler¹¹⁸ indicaram que esse subgrupo pode ser dividido em duas variantes; uma forma nodular e uma difusa. Na forma nodular, quando examinados no pequeno aumento, os linfonodos são geralmente obliterados por nódulos linfóides não muito bem delimitados. O diagnóstico diferencial dessa variante, inclui tanto expansões que conservam o padrão de arquitetura normal dos linfonodos, como aquelas que obliteram a aparência benigna dos folículos linfóides. Na forma difusa, o linfonodo mostra uma predominância de linfócitos pequenos e arredondados, com histócitos espalhados em meio a esses linfócitos e a presença de raras células de Reed-Stenberg. Tem sido observado que até 10% dos pacientes com a forma nodular da predominância linfocitária desenvolvem linfoma não Hodgkin¹²⁹.

A forma histológica celularidade mista é composta de proporções variadas de histiócitos, neutrófilos maduros, eosinófilos, células plasmáticas, linfócitos e numerosas células de Reed-Stenberg. Este tipo histológico geralmente é associado com estádios mais avançados da doença (estádios III e IV) e ocorrem

aproximadamente 70-80% dos casos abaixo de 18 anos, com Doença de Hodgkin no Brasil^{6,36,44} e em 30% daqueles diagnosticados nos países desenvolvidos^{134,183}.

A forma histológica esclerose nodular é encontrada em aproximadamente 20 a 30% de casos abaixo de 18 anos com Doença de Hodgkin no Brasil e em mais de 50% dos casos, com a mesma faixa etária, nos países desenvolvidos. Nos países mais adiantados, esse tipo histológico predomina em adolescentes do sexo feminino^{75,85} que freqüentemente possuem massa no mediastino. Histologicamente, essa forma possui três características: esclerose, que divide os linfonodos em nódulos celulares; células lacunares, que podem estar espalhadas ou agrupadas entre os linfócitos; e células atípicas de Reed-Stenberg. O diagnóstico da forma esclerose nodular geralmente não causa muita dificuldade ao patologista, exceto a variante descrita por Lukes¹¹⁸. Este autor observou que uma variante da esclerose nodular mostra o mesmo "continuum" de desaparecimento progressivo dos linfócitos, que também é observada nas outras três formas histológicas. Contudo, não existe evidências que esses subtipos tenham importância prognóstica¹⁰⁷.

Finalmente, a forma chamada de depleção linfocitária está presente em aproximadamente 5 a 10% dos casos da Doença de Hodgkin, e é freqüentemente encontrada em pacientes mais idosos. Este é considerado o tipo histológico de pior prognóstico e quase sempre está associado com estádios avançados da doença. A característica histológica marcante desse tipo, como o nome indica, é a ausência de linfócitos no tecido reacional do linfonodo envolvido. Além disso, existe a presença de fibrose acelular que ocorre paralelamente ao tecido de sustentação reticular dos linfonodos. Muitos dos pacientes com este tipo histológico apresentam-se debilitados, com febre, presença de hepato-esplenomegalia e linfonodomegalia generalizada e invasão da medula óssea.

1.7 ESTADIAMENTO

O sistema de classificação de Ann Arbor, proposto em 1965, foi formulado com o objetivo de orientar o radioterapeuta a determinar os campos a serem irradiados, e investigar outras formas de tratamento para pacientes com doença avançada. Nessa época, a radioterapia era a única modalidade de tratamento administrada com intenção curativa para pacientes com Doença de Hodgkin, e o papel da quimioterapia nos pacientes com doença avançada começava a ser determinado. Portanto, o estadiamento proposto presumia que a Doença de Hodgkin progride de linfonodo para linfonodo, que radioterapia era o tratamento de escolha (assegurado que todas as áreas nodais envolvidas pudessem ser irradiadas), e que a quimioterapia deveria ser reservada para pacientes com doença disseminada.

Além da extensão da doença graduada de estágio I a estágio IV, os pacientes eram classificados de acordo com a presença ou ausência de certas manifestações clínicas em grupo A ou B. O critério para a inclusão dos pacientes no grupo B é a presença de um dos seguintes sintomas: perda com mais de 10% do peso corporal, sem causa identificada nos 6 meses precedentes ao diagnóstico da Doença de Hodgkin; febre persistente ou recorrente acima de 38°C, sem explicação clínica óbvia, por um mês ou mais precedendo o diagnóstico; e sudorese noturna importante. Subseqüentemente, várias modificações dessa classificação original foram sendo incorporadas, com o objetivo de acomodar o aparecimento de outros fatores prognósticos e outras modalidades efetivas de tratamento. O quadro 3¹¹⁶ descreve uma classificação atualizada para estadiamento da Doença de Hodgkin, baseada na classificação original de Ann Arbor^{31,160} e modificada recentemente na conferência de Costwolds^{115,116}.

QUADRO 3. SISTEMA DE ESTADIAMENTO DE ANN ARBOR

ESTADIO I Envolvimento de uma região linfática ou de órgão extralinfático único do mesmo lado do diafragma.

ESTADIO II Envolvimento de duas ou mais regiões de nódulos linfáticos do mesmo lado do diafragma, ou envolvimento localizado de órgão extralinfático, com sítios de um ou mais regiões de nódulos linfáticos do mesmo lado do diafragma.

ESTADIO III Envolvimento de regiões de nódulos linfáticos em ambos os lados do diafragma, o qual pode ser acompanhado por envolvimento do baço ou por envolvimento localizado de órgãos extralinfáticos.

III₁ : com ou sem hilo esplênico, celiaco ou linfonodos portais.

III₂ : com linfonodos para-aórticos, ilíacos, mesentéricos.

ESTADIO IV Envolvimento difuso ou disseminado de um ou mais órgãos extralinfáticos, ou tecidos com ou sem envolvimento de nódulos linfáticos.

A - sem sintomas.

B - perda de peso, mais de 10% do peso corporal 6 meses prévio ao diagnóstico.

- febre inexplicada - temp. > 38°C.

- sudorese noturna.

X - Dimensão da massa tumoral.

> 1/3 do diâmetro do mediastino.

> 10 cm da dimensão máxima da massa nodal.

E - Envolvimento de único sítio extranodal, contíguo ou proximal ao sítio nodal conhecido.

CS - Estádio clínico

PS - Estádio patológico.

1.8 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

A constatação de que a Doença de Hodgkin era sensível à radioterapia e que determinados subgrupos de pacientes, com esta doença, eram definitivamente curados por essa modalidade de tratamento, estimulou o interesse de investigadores clínicos para desenvolverem programas de tratamento utilizando outras formas de tratamento. Os resultados dessas investigações demonstraram amplamente que pacientes com esta doença poderiam ser curados, não somente pela radioterapia, mas também com uma série de agentes quimioterápicos, geralmente administrados em combinação.

Atualmente, a maioria das crianças com essa doença é curada, mesmo aquelas com estádios mais avançados. Durante muitos anos, o tratamento da Doença de Hodgkin em crianças foi moldado naquele administrado nos adultos, ou seja, radioterapia para doença localizada e quimioterapia para as formas generalizadas. Portanto, radioterapia isolada foi inicialmente utilizada para as crianças com doença relativamente localizada (estádios I a IIIA). Doses de 35-40 cGY foram eficazes para erradicar a doença presente no campo irradiado. Contudo, os resultados empregando apenas a irradiação dos campos envolvidos não foram satisfatórios devido à alta incidência de recidiva tumoral, que ocorria quase sempre fora da área irradiada (em aproximadamente 50% dos casos)¹⁸⁷. Quando o campo a ser irradiado foi ampliado para incluir outras cadeias nodais, os resultados foram muito melhores. Vários estudos consistentemente reportaram taxas de sobrevida livre da doença próximo de 90%, quando a radioterapia de campos ampliados foi utilizada^{57,97}. Em alguns desses estudos, a presença de massa tumoral extensa no mediastino foi considerado um fator de prognóstico adverso^{123,165}.

Embora essa modalidade de tratamento fosse efetiva em conseguir excelentes taxas de sobrevida livre de doença na criança, a irradiação envolvendo extensas áreas

determina alteração severa do crescimento ósseo e do tecido muscular. Além disso, existe uma incidência aumentada de tumores sólidos nas áreas irradiadas. A preocupação com esses efeitos deletérios levou ao desenvolvimento de programas terapêuticos que pudessem minimizar essas complicações, mantendo a mesma taxa de curabilidade. No início dos anos 70, De Vitta e cols.⁵⁰ reportaram que 55% das crianças com doença avançada, tratadas com 6 ciclos mensais de uma combinação de quimioterapia denominada de MOPP (mostarda nitrogenada, oncovin, procarbazina e prednisona), obtiveram remissão completa prolongada. Subseqüentemente, Ziegler e cols.²⁰³ empregaram MOPP para crianças com Doença de Hodgkin, independentemente do estágio clínico da doença. Uma taxa de resposta de mais de 80% foi obtida nesse estudo com 48 crianças (taxa de sobrevida livre de doença de 75%, para pacientes com doença localizada e 60%, para aqueles com doença disseminada). Subseqüentemente, outros estudos demonstraram a eficácia da quimioterapia combinada no tratamento da Doença de Hodgkin^{30,48,72,110,147}.

Por muitos anos a combinação MOPP foi considerada a primeira escolha para o tratamento quimioterápico da Doença de Hodgkin, entretanto, devido a várias complicações associadas com esse regime, outras combinações que produzem a mesma eficácia e possivelmente menos toxicidade foram desenvolvidas. Uma dessas combinações desenvolvida por Bonadona e cols.²¹, denominada de ABVD (adriamicina, bleomicina, vincristina e decarbazine) ganhou notoriedade, porque determina praticamente a mesma eficácia, contudo, sem a maioria dos efeitos secundários atribuídos ao MOPP¹⁹². Outras propostas de tratamento tem incluído doses menores de radioterapia em associação com combinação de agentes quimioterapêuticos^{42,72,73,135,147,179}. A premissa é a de que reduzindo as doses de radioterapia em combinação com a quimioterapia, efeitos colaterais poderiam ser diminuídos mantendo-se os mesmos níveis de eficácia.

Em 1982, os investigadores da Universidade de Stanford iniciaram um estudo administrando baixas doses de radioterapia (15-25 GY), nos campos envolvidos pela doença e 6 ciclos de MOPP/ABVD administrados alternadamente⁵⁵. De 48 crianças que fizeram parte desse estudo, 95% delas estão vivendo livre de doença, com tempo médio de observação de 26 meses. Contudo, metade dessas crianças testadas possuem função pulmonar anormal, e embora os efeitos colaterais associados com a radioterapia tenham diminuídos, não foram completamente eliminados.

Mais recentemente, nos Estados Unidos e Europa, estão sendo conduzido estudos com objetivo de diminuir o número de ciclos de quimioterapia convencional (MOPP e ABVD), ou então utilizar uma combinação completamente diversa. Um exemplo, é o estudo colaborativo que vem sendo realizado pela Stanford Medical Center, St. Jude Children's e Dana Faber, no qual as crianças com doença localizada (estádio clínico I ou II) recebem a combinação de vimblastina, adriamicina, metotrexate e prednisona, associada à radioterapia (15-25 GY). Para os pacientes com a doença avançada, a combinação de quimioterapia é modificada para incluir etoposide no lugar do metotrexate, mantida as mesmas doses de radioterapia.(Comunicação pessoal, Hudson, M. 1993).

Em resumo, as principais modificações que ocorreram nos últimos anos no manejo da criança com Doença de Hodgkin incluem: 1) eliminação da laparotomia e esplenectomia para a grande maioria das crianças; 2) abandono da radioterapia de campos alargados nas doses de 35-45 GY, como modalidade isolada de tratamento; 3) tratamento radioterápico de campos envolvidos, como modalidade isolada apenas para os pacientes com comprometimento de linfonodos cervicais altos (estádio I, de bom prognóstico); 4) tratamento das crianças com doença em estádios precoces, com um número limitado de ciclos de quimioterapia em associação com doses menores de radioterapia; 5) tratamento de pacientes com doença avançada, com um número maior

de ciclos de quimioterapia em associação com doses baixas de radioterapia; 6) altas doses de quimioterapia em conjunto com a infusão de medula óssea autóloga, para as crianças que recidivaram em vigência de tratamento quimioterápico adequado e que possuam doença ainda sensível à quimioterapia. Portanto, o tratamento da Doença de Hodgkin ainda está em evolução. Atualmente, o paciente pediátrico poderá ser manejado com vários procedimentos terapêuticos com grande potencial para erradicar a doença.

Devido às altas taxas de cura da Doença de Hodgkin, poucos são os fatores biológicos preditivos do sucesso terapêutico. O estágio avançado da doença, o tipo histológico celularidade mista e depleção linfocitária, presença de febre, perda de mais de 10% do peso corporal e alterações severas imunológicas presentes ao diagnóstico foram cada um deles, independentemente associados com pior prognóstico^{107,125,134,139,164}. Doença localizada, tipos histológicos predominância linfocítica e esclerose nodular são associados com bom prognóstico. Os casos com o tipo histológico depleção linfocítica, principalmente aqueles com doença avançada, tem o pior prognóstico de todos. Em crianças do nosso continente, a distribuição histopatológica da Doença de Hodgkin mostra um predomínio do subtipo celularidade mista. Contudo, não existem evidências, nos poucos estudos realizados em nosso meio, que esse histiotipo esteja associado com pior prognóstico. Finalmente, as alterações imunológicas encontradas ao diagnóstico dos pacientes com Doença de Hodgkin têm sido associadas à resposta terapêutica. Pacientes, com imunodeficiência que foi adquirida previamente à Doença de Hodgkin, como nos casos de pacientes HIV(+), geralmente possuem doença mais disseminada e pior prognóstico. Dados indiretos que as alterações do sistema imune na Doença de Hodgkin podem influenciar o prognóstico são sugeridos pelo aumento dos receptores solúveis de Interleucina II^{141,142,148} e altos níveis do antígeno solúvel CD8^{149,150} em pacientes que foram considerados preditivos do insucesso terapêutico.

2. AS ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS ASSOCIADAS A DOENÇA DE HODGKIN

É importante considerar o funcionamento do sistema imune, principalmente no que se refere à imunidade celular ou dependente da células T. para melhor compreensão das alterações imunológicas associadas com a Doença de Hodgkin e as razões para a realização do presente trabalho.

Em geral, a imunidade dependente dos linfócitos B, monócitos e neutrófilos não está comprometida nessa doença². Alterações clínicas ou laboratoriais da imunidade humoral nos pacientes com Doença de Hodgkin têm sido observadas nos pacientes que foram submetidos ao tratamento. Citotoxicidade dependente de anticorpos é normal ao diagnóstico, mas está diminuída nos pacientes que receberam tratamento. Essa alteração é mais acentuada nos pacientes que foram tratados com uma combinação de vários agentes quimioterápicos, em conjunção com irradiação nodal total^{14,71}. A esplenectomia, que muitas vezes é realizada como parte integral do estadiamento cirúrgico, isoladamente não determina alteração significativa da imunidade humoral nesses pacientes. Contudo, a taxa de IgM está significativamente diminuída após a quimioterapia em pacientes esplenectomizados, quando comparada com aquela de pacientes que não foram esplenectomizados^{13,18}. Com relação à resposta antigênica seguindo à imunização com produtos bacterianos, ela está relativamente diminuída nos primeiros anos seguindo o término do tratamento, mas tende a normalizar entre cinco a sete anos de remissão completa continuada^{66,79}.

Embora alguns estudos demonstraram uma diminuição da função *in vitro* dos polimorfonucleares, tanto entre os pacientes que receberam tratamento específico como aqueles que não foram previamente tratados, não existe repercussão clinicamente relevante dessas alterações observadas *in vitro*.

Em contraste, existem fortes evidências clínicas e laboratoriais do comprometimento da imunidade celular nos pacientes com Doença de Hodgkin, mesmo naqueles em que a doença clínica não tenha ainda sido desenvolvida^{126,127}. Dorothy Reed (citado por Kaplan¹⁰⁴), foi a primeira investigadora a documentar uma anormalidade imunológica em pacientes com Doença de Hodgkin. Ela observou em cinco de oito pacientes com essa doença, que haviam sido inoculados com tuberculina, não apresentaram resposta a esse teste cutâneo de hipersensibilidade retardada. Essas observações foram mais tarde corroboradas por outros investigadores, não só ao teste cutâneo à tuberculina^{96,180} como a outros antígenos naturais, tais como antígenos bacterianos³³ e paramixovírus^{28,201}.

A interpretação da análise quantitativa do defeito imune através dos testes utilizando substâncias naturais é dificultada, pois não distinguem indivíduos não sensibilizados anteriormente, dos sensibilizados porém não responsivos. Esse tipo de dificuldade pode ser evitada pelo uso de substâncias sintéticas como o 2,4 dinitroclorobenzeno (DNCB) que induzem reações de hipersensibilidade retardada indistinguíveis das induzidas pela tuberculina, podendo assim avaliar quantitativamente a resposta imune avaliada pelo testes cutâneos^{4,33,201}.

Em um estudo, (citado por Kaplan¹⁰⁴), envolvendo 185 pacientes previamente não tratados com a Doença de Hodgkin, estágio I, testados com DNCB, foi alta a taxa de negatividade nestes pacientes do que naqueles observados em controles normais. Em outros estudos, resultados semelhantes foram obtidos por De Gast e cols.⁴⁷ os quais observaram reações negativas ao DNCB em pacientes com Doença de Hodgkin em estádios iniciais, e por Case e cols.³³. Estes últimos autores observaram reações negativas em 24 dos 50 pacientes (48%) com a doença em qualquer estágio, incluindo três de oito pacientes no estágio I. Os resultados dos testes cutâneos, portanto, indicam que o defeito imunológico existente na Doença de Hodgkin não é dependente de seu

estádio e sugerem que esse defeito pode ser importante na patogênese da doença.

Além da diminuição da resposta aos testes cutâneos de hipersensibilidade⁴, os pacientes com Doença de Hodgkin apresentaram uma diminuição do número de células que interagem com hemácias de carneiro (E-Rosetas)²⁰, diminuição da quimiotaxia dos linfócitos, e da resposta proliferativa destas a substâncias mitogênicas (fitoemaglutinina, concanavalina A, e antígenos solúveis)^{93,166}, e a aloantígenos (cultura mista de linfócitos)¹⁰⁹.

Brown e cols.²⁸ foram os primeiros a observar a diminuição de resposta linfoblastóide à fitoemaglutinina em 49% pacientes previamente não tratados com Doença de Hodgkin. Bobrove e cols.²⁰ observaram que a capacidade de formar E-roseta com hemácias de carneiro pelos linfócitos circulantes de pacientes com Doença de Hodgkin, encontrava-se diminuída em 13 de 15 pacientes. Estes autores não observaram associação entre a intensidade da diminuição do número de linfócitos formado por E-rosetas, com a extensão da doença, ou a presença de sintomas constitucionais. Em relação à capacidade dos linfócitos circulantes, responderem à estimulação por linfócitos alogênicos, Lang e cols.¹⁰⁹ notaram que em 7 de 32 (22%) pacientes com Doença de Hodgkin não tratados, a cultura mista de linfócitos apresentou resultados negativos. Resultados similares foram obtidos por Rühl e cols. (citado por Kaplan¹⁰⁴), em um estudo com 30 pacientes com Doença de Hodgkin. O quadro 4¹⁷⁵ sumariza os defeitos da imunidade celular que têm sido detectados em pacientes com Doença de Hodgkin.

Em conseqüência das anormalidades da imunidade celular, os pacientes com Doença de Hodgkin apresentam uma incidência aumentada de infecções causadas por organismos como fungos, vírus, protozoários e principalmente pelo bacilo da tuberculose^{32,37,41,90,106,170}. Em um estudo comparando a incidência de diversos tipos

QUADRO 4. PERFIL IMUNE DOS PACIENTES COM DOENÇA DE HODGKIN

	DOENÇA ATIVA NÃO TRATADA	SOBREVIVENTES LIVRE DE DOENÇA
Produção de anticorpos induzida por antígeno	Normal	Trasitoriamente
Função polimorfonuclear <ul style="list-style-type: none"> • Quimiotaxia • Reatividade metabólica 	Diminuída Diminuída	Diminuída Diminuída
Teste de pele		
Hipersensibilidade retardada <ul style="list-style-type: none"> • Recall antígeno • Neoantígeno 	Anérgico Anérgico	Reativo Anérgico
Formação de E-Roseta	Diminuído	Diminuído
Proliferação de cel. T induzida por mitógenos	Diminuído	Diminuído
Cultura mista de linfócitos <ul style="list-style-type: none"> • Autólogo • Alogênico 	Diminuída Discretamente diminuída	Diminuída Discretamente diminuída
Susceptibilidade para monócito supressor	Aumentada	Aumentada
Susceptibilidade para cels T supressoras	Aumentada	Aumentada
CD4/CD8	Discretamente diminuída	Diminuída

de infecções, ocorrendo em pacientes com linfoma de qualquer tipo, foi notado que aqueles com Doença de Hodgkin tinham uma maior incidência de infecções por herpes zóster, citomegalovírus, *cryptococcus* e *pneumocystis carinii* do que os pacientes com linfoma não Hodgkin¹⁰⁰.

A observação clínica, em conjunto com os resultados dos exames laboratoriais discutidos anteriormente, não permitem a elaboração de um modelo para o entendimento do defeito imune básico na Doença de Hodgkin. Com o aprimoramento das técnicas aplicadas ao estudo da biologia celular e molecular, a fisiologia do sistema imune tem sido elucidada e poderá facilitar a compreensão do defeito imunológico básico da Doença de Hodgkin.

O funcionamento normal desse sistema depende da integração coordenada de vários grupos celulares e hormônios hematopoéticos^{105,140}. De uma forma simples, os papéis principais para o funcionamento do sistema imune são ocupados por diferentes subpopulações que incluem os linfócitos B, originados na medula óssea e responsáveis pela síntese de imunoglobulinas (imunidade humoral); os linfócitos T, derivados do timo, e são responsáveis pela modulação da função imune através de suas funções auxiliadoras e supressoras (imunidade celular); as células "natural Killer" ou NK que aparentemente originaram-se a partir das mesmas células progenitoras dos linfócitos T; e finalmente, os monócitos e macrófagos, que tem um papel importante no processamento e apresentação do material antigênico^{10,95}. Os componentes desse sistema podem ainda ser divididos em dois grupos baseados na forma de ação dos componentes: os linfócitos B, secretam as imunoglobulinas, que podem agir tanto em substâncias antigênicas que estejam dissolvidas em fluidos orgânicos ou fixas em tecidos. O outro grupo é representado pelos elementos que exercem as suas funções mediante o contato celular, por exemplo, os linfócitos T e as células NK que não reconhecem as proteínas antigênicas que estejam em suspensão

em líquidos orgânicos, e para a sua função ser realizada é necessário que os antígenos tenham sido previamente processados e, posteriormente, apresentados por células que expressem na superfície de suas membranas as moléculas do sistema maior de histocompatibilidade (HLA). O evento final será a destruição das células que apresentam o material antigênico, pelas células efectoras do sistema imune¹⁴⁰.

Por muitos anos, existiam evidências laboratoriais que os linfócitos T maduros eram compostos de mais de uma subpopulação com capacidade funcionais distintas, mas somente com o desenvolvimento da tecnologia dos anticorpos monoclonais foi possível a caracterização dessas subpopulações de linfócitos T. As duas subpopulações de maior relevância clínica foram designadas de linfócitos T auxiliares (CD4+), e linfócitos T citotóxico-supressor (CD8+). Indivíduos normais apresentam aproximadamente 60% das células T circulantes do tipo CD4+, e aproximadamente 30% com fenótipo citotóxico-supressor ou CD8+^{58,161}.

Outra particularidade dos linfócitos T quando sensibilizados, é que além dos genes responsáveis pela síntese dos receptores específicos para o reconhecimento dos antígenos, eles ativam outros genes que são responsáveis pela síntese de uma série de substâncias solúveis, que coletivamente são chamadas de linfocinas (ILs) e possuem ação tanto local com sistêmica^{74,161}.

As linfocinas, ou também chamadas de citoquinas, são hormônios peptídicos que funcionam como forma de comunicação entre as células do sistema imune. Existem basicamente quatro componentes envolvidos nessa atividade: a célula produtora da citoquina, a citoquina, o receptor na célula alvo, e a resposta pela célula alvo. Em contraste com os hormônios do sistema endócrino, que são produzidos por um único tipo de célula para atuar sobre outro tipo específico de célula, as citoquinas podem ser produzidas por diferentes tipos celulares e também podem determinar

efeitos biológicos em vários tipos de células. Do ponto de vista funcional, as citocinas mais importantes são a IL-1, IL-2, interferons, e o fator de necrose tumoral. Algumas citocinas possuem funções primárias bem definidas, por exemplo, o interferon gama ativa monócitos e a IL-4 e IL-5 participam da produção de imunoglobulinas.

Em relação ao sistema imune mediado por células T, a importância da IL-1 na ativação da célula T humana tem sido previamente demonstrada^{54,74,121}. A IL-1, que é produzida pelos monócitos e macrófagos após a estimulação antigênica, tem a propriedade de iniciar a proliferação de células T circulantes. Estas ao proliferarem, secretam IL-2. A IL-2, por sua vez, é um fator potente para a proliferação de células T^{74,128}, estimula os monócitos a produzirem o fator de necrose tumoral (TNF)¹⁶¹, e induz células T citotóxicas, células NK e outras células T a se tornarem funcionais. A IL-2 para exercer seu efeito biológico, depende da interação com os receptores localizados na membrana que sejam específicos para a IL-2 (IL-2R) e a posterior transmissão do sinal para o núcleo da célula¹⁵². As células T humanas, em repouso, não expressam normalmente uma grande quantidade de IL-2R, mas estes receptores aumentaram rapidamente após a ativação das células T normais; células B e outras populações de células mononucleares¹⁹⁸ apresentam também essa estrutura proteica.

Os IL-2R possuem uma estrutura molecular de cadeia dupla, a cadeia beta (Tac molécula) que tem baixa afinidade pela IL-2 e a cadeia alfa com afinidade intermediária. A associação não covalente entre essas duas cadeias faz do IL-2R um receptor de alta afinidade pela IL-2^{45,69}. A maioria das populações celulares, exceto a dos linfócitos T, possui apenas as cadeias de afinidade baixa ou intermediária, sugerindo que o papel destes receptores nessas células seja diferente daquele exercido pelos receptores completos de linfócitos T. Outro fato de importância biológica ainda não completamente elucidado, é que os IL-2R ligados à membrana são liberados no

plasma após a ativação. Esses receptores em forma solúvel (sIL-2R) podem ser detectados por técnicas de enzima imunoensaio¹⁶³ e os níveis de sIL-2R estão aumentados no meio sobrenadante após a estimulação das células T *in vitro*¹⁶³, assim como *in vitro* em algumas situações clínicas^{38,108,122,151,153,169,182,197}.

Taxa aumentada desses receptores solúveis tem sido encontrada em uma variedade de doenças neoplásicas linfoproliferativas e hematológicas^{122,141,142}. Este aumento, pode ser devido à liberação por células ativadas normais ou por células neoplásicas que constitucionalmente expressam a molécula IL-2R.

O quadro 5¹⁰⁵ apresenta os principais componentes do sistema celular da imunidade e a relação entre os linfócitos T e as células NK.

QUADRO 5. COMPONENTES DO SISTEMA DA IMUNIDADE CELULAR

1. MONÓCITOS/MACRÓFAGOS

2. LINFÓCITOS T

2.1. Linfócitos T reguladores

- . Células auxiliares
- . Células supressoras

2.2. Linfócitos T efetores

- . Hipersensibilidade Tardia
- . Reação Mista de Linfócitos
- . Linfócitos T Citotóxicos (CTL ou células Killer)

Devido às alterações da Doença de Hodgkin serem predominantemente dos linfócitos T, estudos com a finalidade de quantificar as subpopulações CD4+/CD8+ e níveis de citocinas e seus receptores têm sido realizados em pacientes com essa doença. Posner e cols.¹⁴⁵ estudaram 20 pacientes com diagnóstico de Doença de Hodgkin, sem tratamento prévio, e verificaram que o número de linfócitos CD4+, CD8+ e a relação entre as células (CD4+)/(CD8+) possuíam valores dentro dos limites da normalidade. Outros investigadores^{112,193} observaram, após o término do tratamento, uma moderada redução de linfócitos T CD4+ e um aumento das células T CD8+, o que determinou uma diminuição significativa no valor da relação CD4+/CD8+. Outros estudos indicaram que a intensidade das alterações descritas para a subpopulações de linfócitos CD4+/CD8+ está relacionada com o estadiamento clínico avançado da doença e a presença de sintomas constitucionais ao diagnóstico. Devido a que esses pacientes são tratados mais intensivamente, é possível que essas alterações sejam decorrentes da terapia e não devidos à própria doença¹⁴⁴.

Outra possível explicação teórica para diminuição da imunidade celular, observadas em pacientes com Doença de Hodgkin, seria a da existência de um processo anormal previamente adquirido - de origem imune ou infecciosa - que levasse o organismo a responder cronicamente com fatores que bloqueassem a atividade normal do sistema imune mediada por células. Esses fatores solúveis poderiam incluir as prostaglandinas⁷⁷, os anticorpos linfocitotóxico¹⁶², e outros inibidores^{62,94,167}; alternativamente, pela diminuição de fatores referidos acima e que são essenciais para a proliferação dos linfócitos T.

O desenvolvimento de técnicas laboratoriais sofisticadas tem possibilitado a investigação mais detalhada da importância das linfocinas/citocinas e seus receptores celulares na patogênese da Doença de Hodgkin^{63,152}, Ford e cols.⁶⁴, observaram uma diminuição da produção da Il-2, após estímulo específico, por células mononucleares

de sangue periférico de pacientes com Doença de Hodgkin. Essa inabilidade de gerar IL-2 pode refletir um defeito celular primário ou um defeito regulatório, dando origem à hiporesponsividade da célula T, freqüentemente observado em pacientes com Doença de Hodgkin. Recentemente, Pizzolo e cols.¹⁴² demonstraram em uma série de 23 pacientes com Doença de Hodgkin, a associação de um alto nível sérico de IL-2R com indicadores clínicos de uma maior severidade da doença. O excesso desses receptores liberados *in vitro* poderiam competir com aqueles normalmente expresso na superfície da membrana celular pela IL-2 e determinar uma diminuição relativa na proliferação das células T.

Da mesma forma, as moléculas CD8 e CD4 expressas pelos linfócitos T podem ser determinadas no soro por métodos sorológicos específicos⁶⁷. O mecanismo de liberação desses receptores das células é desconhecido⁶⁸. Pui e cols.¹⁵⁰ encontraram altos níveis séricos de antígeno CD8 em crianças com diagnóstico de Doença de Hodgkin. Este aumento estava relacionado com os estádios clínicos mais avançados da doença, a forma sintomática "B", ao tipo histológico celularidade mista e a uma pior resposta terapêutica. Dados semelhantes foram observados na leucemia linfoblástica aguda e linfoma não Hodgkin¹⁴⁹.

Os achados de alteração da função imune celular observados na Doença de Hodgkin ainda estão incompletos. É possível que com a utilização de novas metodologias de investigação do sistema imune, poderão ser revelados indicadores com valor prognóstico, como também possibilitar um maior entendimento da fisiopatologia da doença e das variações clínicas e biológicas encontradas em diversas regiões geográficas.

OBJETIVOS

- Determinar os indicadores imunológicos de subpopulações de linfócitos T(CD4 e CD8) em pacientes abaixo de 22 anos com doença de Hodgkin.
- Determinar associação desses marcadores com as características clínicas e biológicas da doença.

CASUÍSTICA

1. População de referência

A população de referência consistiu de pacientes com diagnóstico de Doença de Hodgkin, com idade igual ou inferior a 22 anos.

2. População de estudo

Este grupo foi formado por pacientes de ambos os sexos, com idade variando de 3 a 22 anos, com diagnóstico clínico, laboratorial e histopatológico de Doença de Hodgkin, examinados no período de agosto de 1989 a outubro de 1991, sem tratamento prévio.

2.1. Fonte

Instituições brasileiras que recebem este tipo de pacientes para tratamento: Hospital de Clínicas (Curitiba), Hospital Infantil Pequeno Príncipe (Curitiba), Hospital Erasto Gaertner (Curitiba), Hospital Osvaldo Cruz (Recife), Instituto da Criança (São Paulo), Instituto Nacional do Câncer (INCA-Rio de Janeiro).

2.2. Critérios de diagnóstico

Baseiam-se na classificação histopatológica com os critérios propostos por Rye¹⁵⁴.

2.3. Critérios de exclusão dos pacientes

Pacientes que receberam medicação quimioterápica prévia ou que não preenchiam os critérios propostos por Rye .

2.4. Critérios de definição clínica , laboratorial e estadiamento de Doença de Hodgkin...

2.4.1. Critérios clínicos

Mediante a história clínica e exame físico detalhados no anexo 7.

2.4.1.1. Critérios para classificação em grupos A e B

A- sem sintomatologia

B- com sintomatologia incluindo um ou mais sintomas que seguem:

- . perda de peso de 10% do peso corporal em 6 meses antes do diagnóstico;
- . febre com temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$ sem causa definida e
- . sudorese noturna.

2.4.2. Avaliação laboratorial

Incluem hemograma completo com VHS, transaminases (pirúvica e oxaloacética), bilirrubinas, fosfatase alcalina, LDH, mucoproteína, uréia, creatinina , aspirado e biópsia de medula óssea, assim como biópsia de linfonodo ou de órgãos intracavitários para diagnóstico histopatológico.

2.4.3. Critérios para estadiamento

O estadiamento clínico e/ou cirúrgico obedeceu à classificação de Ann Arbor^{31,160} para a Doença de Hodgkin, baseando-se nos achados de história clínica e exame físico, estudos radiológicos, incluindo tomografia computadorizada, aspirado e/ou biópsia de medula óssea, laparotomia exploradora e/ou esplenectomia e biópsia de linfonodo.

2.4.4. Critérios para divisão dos pacientes em grupos

Os estadios foram agrupados em:

- doença localizada - estadios I / II
- doença avançada - estadios III / IV

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

1.1 Equipamentos

- Agitador magnético Mixtro, Toptronix, Ind. brasileiro.
- Agulhas descartáveis.
- Balança selecta Semi Mikro 100gr., Sartorius Werke, Germany.
- Banho Maria 37°C, Soc. Fabbe Ltda, mod. 169, SP, Brasil.
- Câmera Neubauer.
- Citocentrífuga - Shandon - Cystospin 2.
- Centrífuga Excelsa 2 , modelo 205 N, Fanen LTDA, ind. brasileira.
- Centrífuga internacional tam. 2, mod. V, internacional equipament CO. , Boston. Mass., USA.
- Contador automático de células sanguíneas Couter Counter mod. S.SR., Coulter electronics, Inc. Flórida, USA.
- Freezer -80°C indrel. mod. IVLT 200, Brasil.
- Freezer -20°C Prosdócimo, ind. brasileira.
- Geladeira (-2 a -8°C) Prosdócimo, ind. brasileira.
- Lâminas para microscópio e lamínulas.
- Microscópio óptico Olympus CBA-K, Tokio, Japão.
- Microscópio de imunofluorescência Olympus CBA, Tokio.
- Pipetas de vidro de 1 a 10 ml.
- Pipetas Pasteur, Fischer Scientific Co., Pittsburg, USA.
- Pipetadores automáticos com ponteiras descartáveis de 20, 25, 100 microlitros. Eppendorf 3130 (Germany), Gilson p200 (France).
- Placas de microtitulação de polivinil com 96 escavações e fundo em V (Costar).

- Selos auto-adesivos de acetato para placas (plate sealer), linbro Titertek. Flow laboratories, inc, Virginia., USA.
- Seringas plásticas descartáveis de 5 a 10 ml, plastipak BD.
- Suporte de poliestireno para placas de microtitulação.
- Tubos cônicos de plástico graduados com capacidade de 50 ml , Falcon 2070, Becton Dickinson, CA, USA.
- Tubos cônicos graduados de 15 ml, Corning, NY.
- Tubos de hemólise de poliestireno de 50 x 10 mm.

1.2. Reagentes e soluções

- Acetona 100%.
- Ácido Acético glacial 95%
- Albumina bovina, sigma chemical CO., ST Louis, USA.
- Azida sódica 1%, Fischer scientific company.
- Azul de tripan 1% (Tripan blue), KK laboratories, inc. Plasmaview, NY, USA.
- Solução EDTA sódico a 2% de soro fisiológico.
- Solução corante na proporção de 3:10 de azul tripam em EDTA sódico.
- Cloreto de sódio a 0,85 g%.
- Corante de May-Grünwald-Giemsa corante azul de metileno a 0,33 g% em PBS.
- Eritrócitos de carneiro em meio Alsever.
- Etanol absoluto, Merck SA., Ind.Químicas, RJ, Brasil.
- Glicerina tamponada (60% glicerol em PBS + 0,1 azida sódica).
- Heparina, Liquevine Roche 5000 UI de heparina/ml.
- Histopaque 1077(Lymphocyte Separation Medium), Sigma Diagnostics, ST. Louis, MO, USA.
- Tris cloreto de amônio- tampão tris com ph 7,2 - 7,4 em 9 volumes de cloreto de amônio, armazenado a 4°C.

- Meios:

***HANKS**

* SM ("Staining media") : Hanks	100 l
azida sódica 1%	1ml
albumina bovina 1%	0,100g.

- Soros

- Soro AB inativo por 30 minutos a 56°C, obtido de doadores masculinos não transfundidos, junto ao banco de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR, distribuídos em alíquotas de 1 ml e preservado a -20°C.

- Soro AB adsorvido com eritrócito de carneiro: soro AB de indivíduos adultos normais adsorvido com eritrócitos de carneiro, na proporção de 2 volumes de soro previamente inativo. Esta mistura foi mantida 2 horas em Banho-Maria a 37°C e 2 a 24 horas a 4°C, sendo então centrifugado e separado o soro adsorvido, que foi distribuído em alíquotas de 0,1ml e estocado a -20°C.

- Conjugados de imunofluorescência produzido em cabra anti-mouse Ig conjugado a fluoresceína.

- Especificação dos anticorpos monoclonais de células T.

CD2 - pan T

CD3 - células T periféricas maduras.

CD4 - células auxiliares (Th)

CD8 - células T supressoras (Ts).

- Anticorpos monoclonais utilizados nas placas de microtitulação para imunofluorescência indireta:

ANTICORPO MONOCLONAL	PROCEDÊNCIA
CD2* (leu 5b, T11)	DAKO
CD3* (leu 4, T3)	DAKO
CD4 (leu 3a, T4)	DAKO
CD8 (leu 2a, T8)	DAKO
UPC (controle negativo)	Cedido pelo Dr. Joseph Mirro

*CD - "Cluster designation" - Second International Workshop of human Leukocyte Differentiation Antigens.

2. Métodos

2.1 Colheita de material

O material para marcadores de superfície foi obtido por punção venosa de sangue periférico (5-8ml) em seringa heparinizada.

2.2 Obtenção das células linfóides e ajuste da concentração²⁵.

O material obtido por punção venosa de sangue periférico em quantidades que variaram de 5-8ml, foi diluído em SM (staining media) até o volume de 24ml em tubo cônico de plástico com capacidade de 50ml.

Após homogeneização, esta solução foi passada para dois tubos cônicos com capacidade de 15ml, contendo 3ml de Histopaque. Estes tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1800 rpm. Com a centrifugação ocorre a formação de um anel de células mononucleares por gradiente de densidade(1.077). Os anéis de células mononucleares foram separados em tubo de hemólise e lavados 2 vezes com SM por 10 minutos a 1500 rpm. A concentração das células foi então ajustada com SM para 2×10^7 células/ml, e depois foi diluída em igual volume com uma solução a 40% de soro AB, resultando uma concentração final de 1×10^7 células /ml. Esta solução ficará a 4°C por 30 minutos, depois será submetida a 2 lavagens, ficando a uma concentração de 1×10^7 células/ml (volume final 1,8-2 ml).

2.3 Preparo das placas de microtitulação.

As placas de microtitulação de polivinil com 96 escavações foram lavadas com SM sendo, em seguida, acrescentados 25 microlitros de cada um dos reagentes em escavações previamente definidas. Estas placas foram recobertas com selos-auto-adesivos e estocados a -70°C até o uso.

2.4 Técnica de imunofluorescência indireta em placas de microtitulação⁹⁹.

Retira-se do freezer a -70°C a placa contendo os anticorpos monoclonais, permitindo o descongelamento na temperatura de geladeira (4°C). A suspensão de células na concentração previamente ajustada 1×10^7 cel/ml (em 20% de soro AB) e incubada por 30 minutos a temperatura de 4°C . Após este tempo, as células são lavadas duas vezes em SM por 10 minutos a 1500 rpm e ressuspendidas em SM na concentração de 1×10^7 cel/ml. Acrescenta-se, então 25 microlitos da suspensão de células ($2,5 \times 10^7$ células) em cada escavação da placa de microtitulação, que contém os anticorpos monoclonais, e incuba-se esta placa em câmara úmida por 30 minutos a 4°C . Decorrido este tempo, cada escavação de placa com a mistura é acrescida de 100 microlitos de SM gelado e a placa é centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm com auxílio de suporte de poliestireno, repetindo-se esta etapa de lavagem por 3 vezes.

Após isto, acrescenta-se a cada escavação 25 microlitros de conjugado fluoresceinado (FICT, Goat anti-mouse), que é um anticorpo (secundário) anti- IgM e IgG previamente diluído e titulado. Incuba-se novamente em câmara úmida a 4°C por mais 45 minutos e em seguida lava-se as escavações 3 vezes com SM, como mencionado anteriormente.

Após a última lavagem e flicagem acrescenta-se 10 microlitros de glicerina tamponada a cada escavação, ressuspende-se as células e transfere-se o conteúdo para uma lâmina de microscópio, que é recoberta com lamínula e vedada.

Procede-se, então, a avaliação da positividade de células em microscópio de imunofluorescência. Linfócitos positivos tem um anel fluorescente na sua superfície ou mostram um pontilhado brilhante na membrana da célula. A avaliação da positividade das células é obtida contando 100 a 200 células. O número de células obtidas é expresso como porcentagem do número total de células da preparação.

2.5 Outros exames complementares

2.5.1 Contagem de células sanguíneas.

O sangue periférico dos pacientes foi coletado em vidros de 5 ml contendo EDTA potássio para a rotina de valores hematimétricos. A contagem de células sanguíneas foram realizadas com Coulter Counter nas instituições de origem. A contagem diferencial das células foi realizada em lâminas pelo May-Grünwald-Giemsa. A contagem absoluta de linfócitos foi determinada multiplicando-se o número total de leucócitos, pelo percentual de linfócitos periféricos.

2.5.2 Raio X de tórax e esqueleto

O raio X de tórax foi realizado em todos os pacientes, porém o raio X de esqueleto, em pacientes com manifestações ósseas importantes.

2.5.3. Ecografia Abdominal

Realizado em todos os pacientes para avaliação da doença infradiafragmática.

2.5.4. Tomografia computadorizada de tórax e/ou abdômen

Realizada em pacientes cuja avaliação radiológica e ecográfica foram insuficientes para avaliação da extensão do comprometimento da doença.

2.5.5. Análise histopatológica

Foram realizadas, seguindo os critérios propostos por Rye¹⁵⁴, por patologistas especializados das diversas instituições brasileiras. O material histopatológico era constituído por biópsias de linfonodos periféricos e/ou intracavitários ou biópsias de órgãos intra-abdominais em pacientes submetidos a laparotomia exploradora para estadiamento.

2.6 Manifestações clínicas

Considerou-se visceromegalia quando o fígado e/ou baço mediam mais de 5 cm abaixo do rebordo costal direito e esquerdo, respectivamente, ou se apresentava aumentado nos laudos ecográficos abdominais.

Considerou-se massa mediastinal ou retroperitoneal quando esta alteração foi detectada mediante radiografia simples de tórax, nas incidências ântero-posterior e perfil e através da ecografia e/ou tomografia abdominal, respectivamente.

Considerou-se linfonomegalia quando os linfonodos mediam mais do que 2 cm de diâmetro.

2.7 Análise estatística

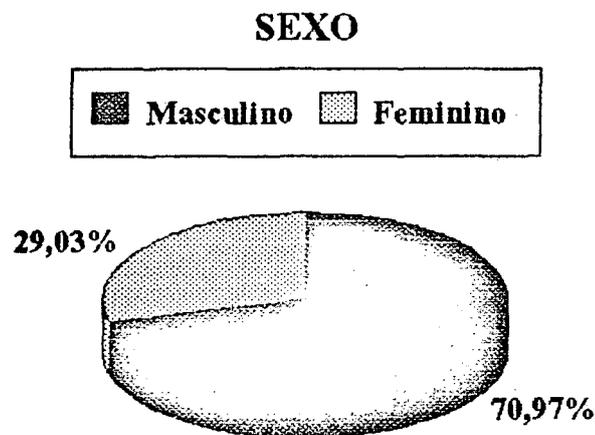
A análise dos marcadores imunológicos CD4 e CD8, relacionados ao estadiamento clínico, foi realizada através do teste "t de student" e o teste exato de Fisher (análise de proporções). Quanto à presença dos sintomas A e B, realizou-se um teste de igualdade ou de não variância e quando indicado aplicou-se o teste "t de student", considerando variâncias independentes. A regra de decisão foi construída considerando um nível de significância igual a 5% ($p < 0.05$). Alguns parâmetros clínicos e laboratoriais foram submetidos ao cálculo da média aritmética, desvio padrão, mediana, teste de diferenças de médias independentes "t de student".

RESULTADOS

1. Caracterização dos casos com Doença de Hodgkin.

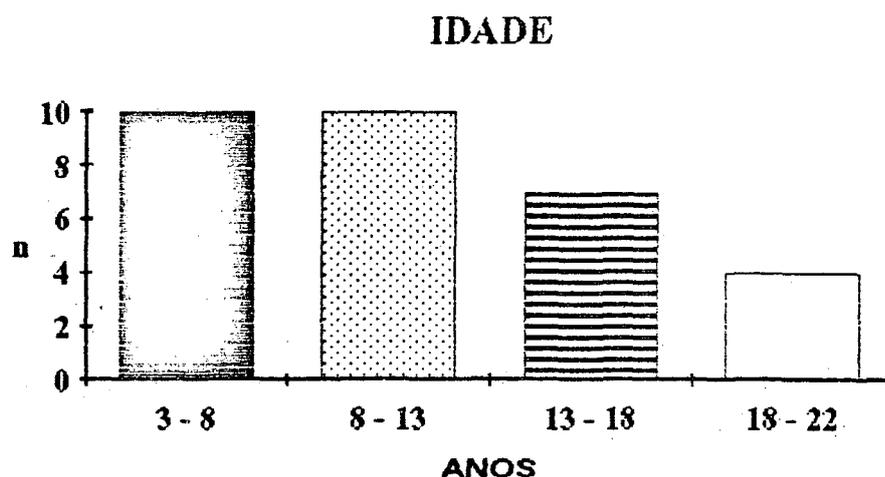
Os anexos 1 a 7 descrevem as características clínicas e biológicas dos pacientes estudados neste trabalho. Foram estudados trinta e um pacientes com Doença de Hodgkin, sendo 22 (71%) pertencentes ao sexo masculino e 9 (29%) ao sexo feminino, com um predomínio do sexo masculino sobre o feminino (M:F=2.4:1)(Figura 1.).

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO SEXO



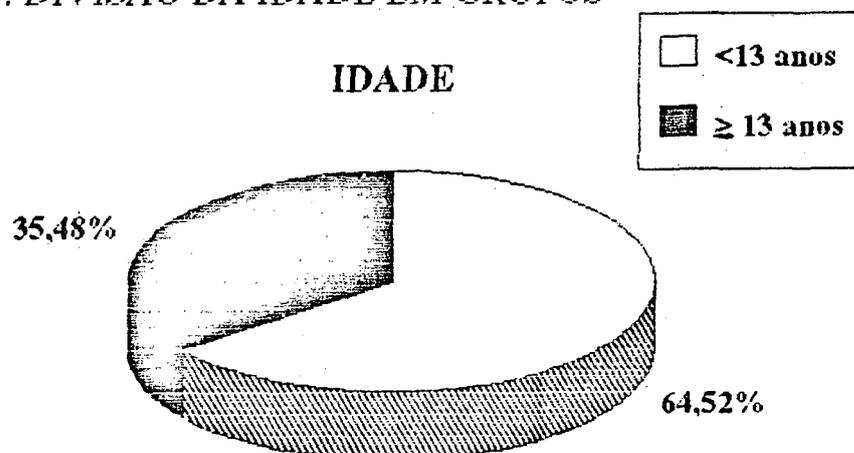
A idade dos pacientes variou de 3 a 22 anos, com uma idade média de 11 ± 1.0 anos. Vinte pacientes (64.5%) se encontram abaixo de 13 anos, 7 pacientes (22.58%) entre 13 e 18 anos e 4 pacientes (12.90%) entre 18 e 22 anos(Figura 2.).

FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS SEGUNDO A IDADE



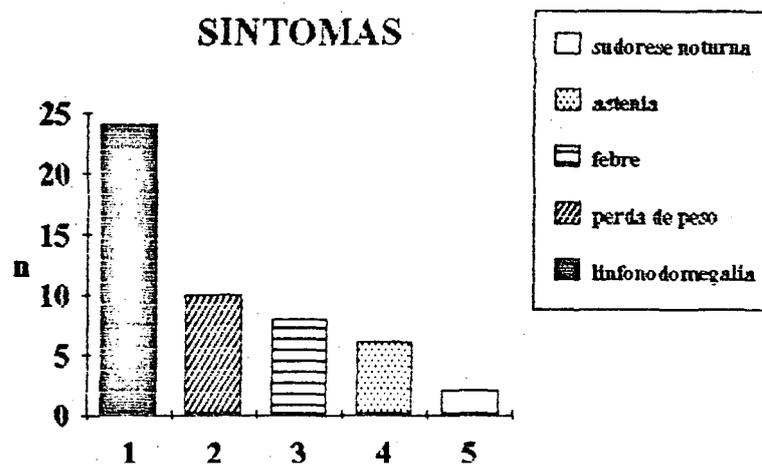
Esses pacientes foram subdivididos em dois grupos: o primeiro grupo de pacientes que se encontravam na faixa etária menores de 13 anos (20 pacientes) e o segundo, pacientes acima ou igual a 13 anos (11 pacientes)(Figura 3.). No grupo de pacientes abaixo de 13 anos, 15 pacientes apresentavam doença localizada (estádio I/II) e 5, doença disseminada (estádio III/IV) e quanto ao subtipo histológico 18 eram CM, 1EN e 1 PL. Acima desta faixa etária 3 pacientes pertenciam ao estágio I/II e 8 ao estágio III/IV, 4 pacientes com o subtipo histológico CM, 2PL e 2DL.

FIGURA 3. DIVISÃO DA IDADE EM GRUPOS



A duração dos sintomas clínicos antes do diagnóstico variou de 1 a 24 meses, com uma média de 6,5 meses. Considerando que cada paciente pode apresentar mais de um sintoma da doença ao diagnóstico, pode-se observar a distribuição de frequência dos sintomas encontrados nos 31 pacientes (Figura 4).

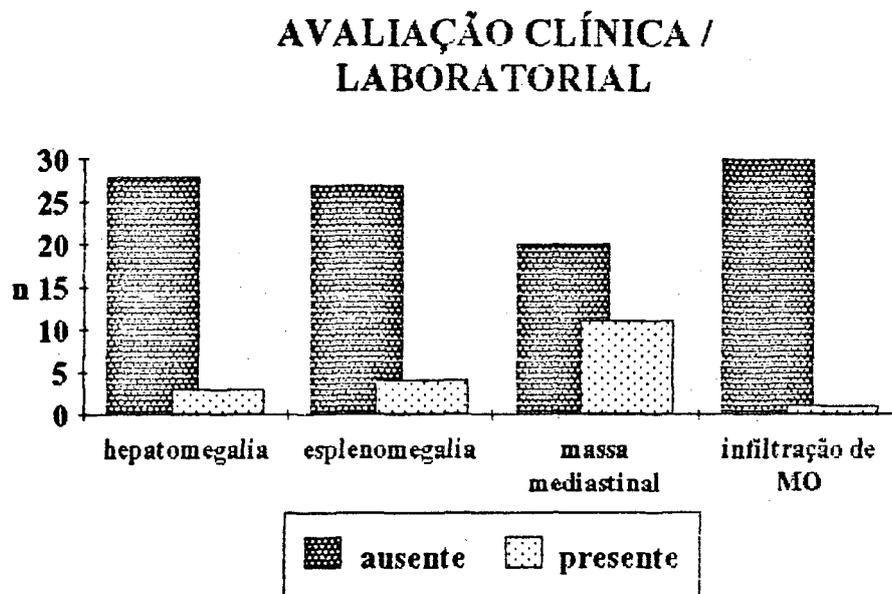
FIGURA 4. PRINCIPAIS SINTOMAS AO DIAGNÓSTICO



Linfonodomegalia foi o sintoma mais freqüente, observado em 24 pacientes (77.4%). O aumento de linfonodos cervicais eram apresentados de forma isolado ou combinado ao aumento de outros grupos de linfonodos: axilares, supraclaviculares e/ou inguinais. O aumento de linfonodos inguinais isolados foi observado em 2 pacientes. Perda de peso foi observado em 10 pacientes (32.2%), febre em 8 pacientes (25.8%), outras manifestações menos freqüentes, como astenia, em 6 pacientes (19.4%) e sudorese noturna em 2 pacientes (6.5%).

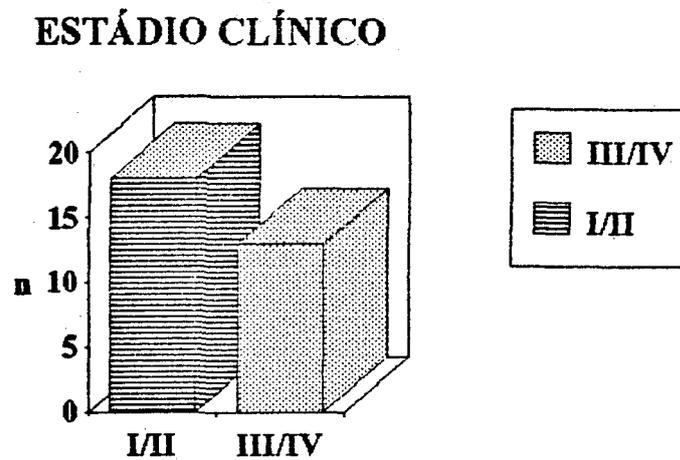
Hepatomegalia foi observada em 3 pacientes (9.68%) e esteve ausente em 28 pacientes (90.32%). Quanto ao tamanho do baço, observamos que 27 pacientes (87.10%) não apresentavam esplenomegalia e 4 pacientes (12.90%) mostravam esplenomegalia ao estudo de imagem. Massa mediastinal foi encontrada em 11 pacientes (35.48%) e envolvimento da medula óssea ao diagnóstico, observado em 1 paciente (3.22%)(Figura 5).

FIGURA 5. SINAIS CLÍNICOS



A doença nos 31 pacientes foi estadiada de acordo com a classificação de Ann Arbor para a Doença de Hodgkin (quadro 3). Sete pacientes (22.6%) tinham estágio I, onze pacientes (35.5%) estágio II, nove (29.0%) estágio III e quatro (13.0%) estágio IV. Os pacientes foram agrupados em doença localizada (estádios I/II) com dezoito pacientes (58.06%) e doença disseminada (estádios III/IV) com treze pacientes (41.94%)(Figura 6). Dos pacientes pertencentes ao estágio clínico II, 3/11 apresentavam doença restrita ao abdômen.

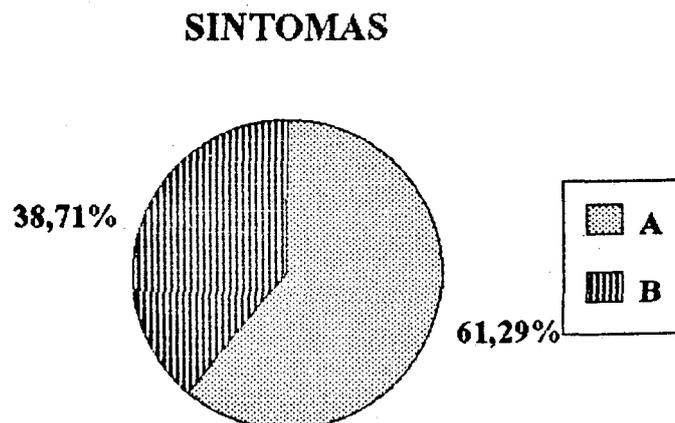
FIGURA 6. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS NOS ESTÁDIOS CLÍNICOS



Entre os 31 pacientes, 8 foram submetidos a estadiamento cirúrgico; destes, dois pertenciam ao estadiamento clínico IA, três ao estágio IIA, um ao estágio IIIA, um ao estágio IIB e um ao estágio IIIB. Não houve mudança no estadiamento clínico, após o estadiamento cirúrgico.

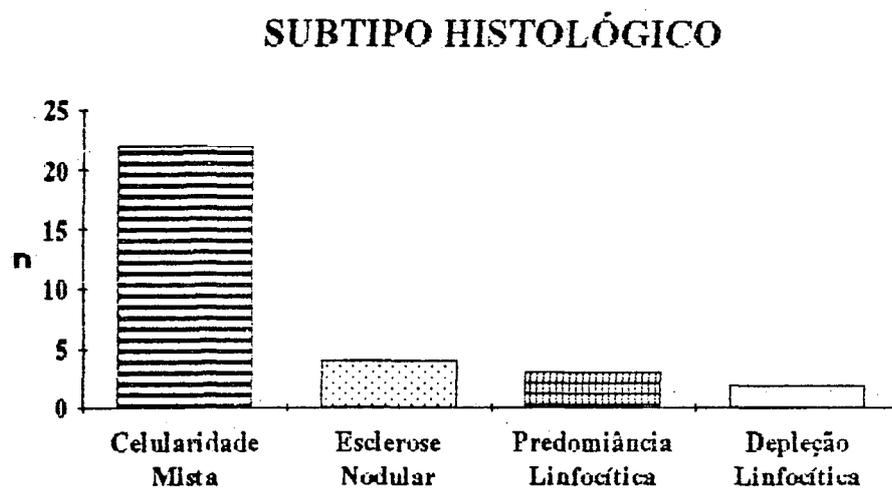
Em relação a sintomas A e B, os pacientes foram separados em 2 grupos : grupo A com 19 pacientes (61.30%) que não apresentavam sintomas ao diagnóstico (perda de peso, sudorese noturna e febre) e grupo B com 12 pacientes (38.70%) que apresentavam os referidos sintomas ao diagnóstico (Figura 7).

FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM SINTOMAS A e B



O diagnóstico histopatológico do material obtido por biópsia dos linfonodos periféricos ou órgãos intracavitários foram agrupados seguindo os critérios propostos por Rye, tendo sido encontrados 22 (70.97%) casos do tipo histológico celularidade mista, 4 (12.90%) casos de esclerose nodular, 3 (9.68%) casos de predominância linfocítica e 2 (6.45%) casos de depleção linfocítica.(Figura 8).

FIGURA 8. DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS NOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS



Com relação aos valores hematimétricos, a taxa de hemoglobina em 29 pacientes variou de 7.7 a 16 g/dl, com valor médio de 11.2 ± 2.02 g/dl. A contagem de leucócitos ao diagnóstico considerados em 30 pacientes variou de 2.100 a 19.100/mm³, com uma média de 10.400 ± 4.050 por mm³. A contagem de plaquetas variou de 220.000 a 846.000/mm³, com uma média de 405.000 ± 165.720 /mm³.

O número de linfócitos no sangue periférico de 30 pacientes ao diagnóstico variou de 84 a 8.820 /mm³ com uma média de 2.436 ± 1.552 ./mm³. A velocidade de hemossedimentação(VHS) na primeira hora foram considerados em 23 pacientes, que variou de 5 a 130 mm, com uma média de 46 ± 35.16 mm. Estes dados estão resumidos na tabela 1.

TABELA 1. VALORES HEMATIMÉTRICOS DOS CASOS ESTUDADOS(n=31)

DADOS			NÚMERO	%
Hemoglobina (g/dl)	V = 7.7-16	7-10	10	34,48
	X = 11.2	10-13	12	41,38
	DP = 2.02	13-16	07	24,14
Leucócitos (mm ³)	V = 2.1-19.1x10 ³	<10.000	16	53,33
	X = 10.4x10 ³	≥10.000	14	46,67
	DP = 4.050			
Plaquetas (mm ³)	V = 220-846x10 ³	<400.000	16	57,14
	X = 405x10 ³	≥400.000	12	42,86
	DP = 165.72x10 ³			
Linfócitos (mm ³)	V = 84-8.820	<2.000	13	43,33
	X = 2.436	≥2.000	17	56,67
	DP = 1.552.67			
VHS 1° hora	V = 5-130	<30	06	26,09
	X = 46	30-50	09	39,13
	DP = 35.16	≥50	08	34,78

Quanto aos valores bioquímicos, as transaminases oxaloacética (TGO) e pirúvica (TGP) de 28 pacientes variaram de 2 a 60 u/l e 4 a 92 u/l com a média de 20.96 ± 15.24 u/l e 18.21 ± 18.27 u/l, respectivamente. A fosfatase alcalina variou de 6.5 u/l a 722 u/l, com a média de 204.15 ± 192.07 u/l. A dosagem da desidrogenase láctica (LDH) em 19 pacientes variou de 100 u/l a 473 u/l, com uma média de 287.16 ± 96.72 u/l. Estes dados estão resumidos na tabela 2.

TABELA 2. VALORES BIOQUÍMICOS DOS CASOS DE DOENÇA DE HODGKIN (n=31)

VALORES		NÚMERO	%
Transaminases		28	90.32
• Oxaloacética	V = 2- 60	< 20	15
(U/L)	X = 20.96	≥ 20	13
	DP = 15.24		
• Pirúvica	V = 4-92	< 25	24
(U/L)	X = 18.21	≥ 25	04
	DP = 18.27		
Fosfatase alcalina		18	58.07
(U/L)	V = 6.5-722	< 450	16
	X = 204.15	≥ 450	02
	DP = 192.07		
Desidrogenase		19	61.30
láctica	V = 100-453	< 240	05
(U/L)	X = 287.16	≥ 240	14
	DP = 96.72		

Para a caracterização dos marcadores imunofenotípicos, os linfócitos obtidos de sangue periférico foram estudados em 26 pacientes pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando os anticorpos monoclonais CD4 e CD8 . Os valores médios obtidos foram $CD4 = 41.96\% \pm 16.36$, $CD8 = 27.07\% \pm 13.26$ e a relação $CD4/CD8 = 1.97 \pm 1.26$. Estes dados estão resumidos na tabela 3.

A contagem do número absoluto de linfócitos no sangue periférico e a distribuição dos marcadores de superfície celular dos linfócitos T circulantes, nos estádios clínicos e sintomas A e B desses pacientes estão demonstrados no anexo 6 e 7, respectivamente.

TABELA 3. MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM 26 PACIENTES

		DADOS	NÚMERO
Marcadores Imunológicos	CD4	V = 14-78	26
	(%)	X = 41.96	
		DP = 16.36	
	CD8	V = 7-61	26
	(%)	X = 27.07	
		DP = 13.26	
	CD4/CD8	V = 0.41-5.6	26
		X = 1.97	
		DP = 1.26	

2. Análise dos Dados Clínicos e Laboratoriais

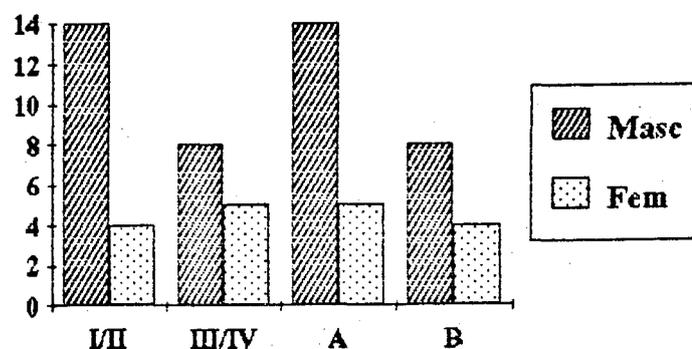
2.1. Sexo e Idade

Quando o gênero (masculino ou feminino) foi analisado em relação ao estadiamento (doença localizada ou disseminada), foram observados que 14 casos do sexo masculino tinham doença localizada (estádio I/II), enquanto 4 casos do sexo feminino tinham este estágio. Em relação a sintomas A e B, 14 casos do sexo masculino pertenciam ao grupo de sintomas A, enquanto 5 casos eram do sexo feminino.

A análise desses dados não foi estatisticamente significativa ($p > 0.05$, teste exato de Fisher), portanto não existiu uma associação entre o gênero e o estágio da doença, assim como a sintomas A ou B (Figura 9).

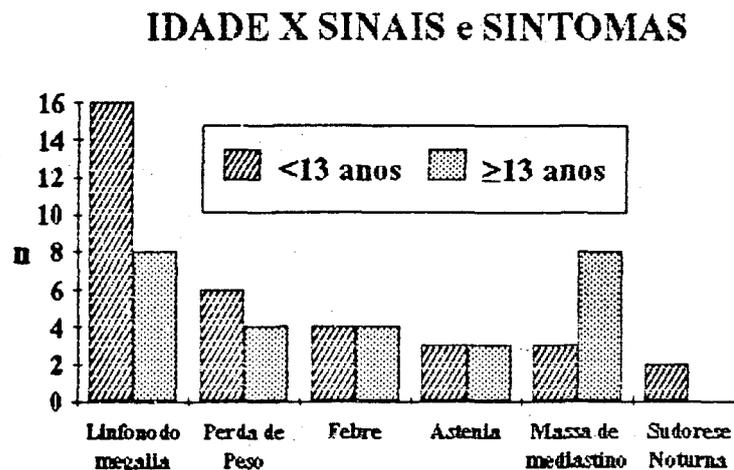
FIGURA 9. ANÁLISE DO SEXO COM ESTÁDIO CLÍNICO E SINTOMAS A e B

SEXO X ESTÁDIO e SINTOMAS A e B



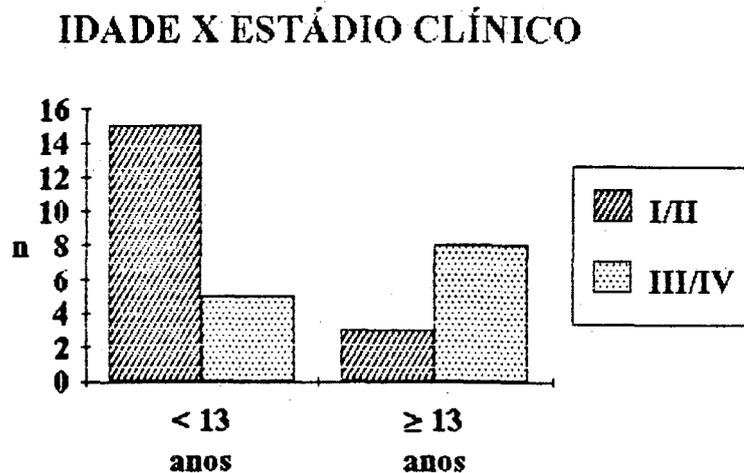
Quando a faixa etária foi analisada em relação às manifestações clínicas, observamos que 8 pacientes acima de 13 anos apresentavam massa de mediastino ao diagnóstico, enquanto 3 pacientes abaixo de 13 anos apresentavam essa manifestação. Esse dado foi estatisticamente significativo ($p < 0.0023$; teste exato de Fisher), demonstrando que massa de mediastino estava mais relacionada a pacientes com idade acima de 13 anos (Figura 10).

FIGURA 10. ANÁLISE DA IDADE COM OS SINAIS E SINTOMAS



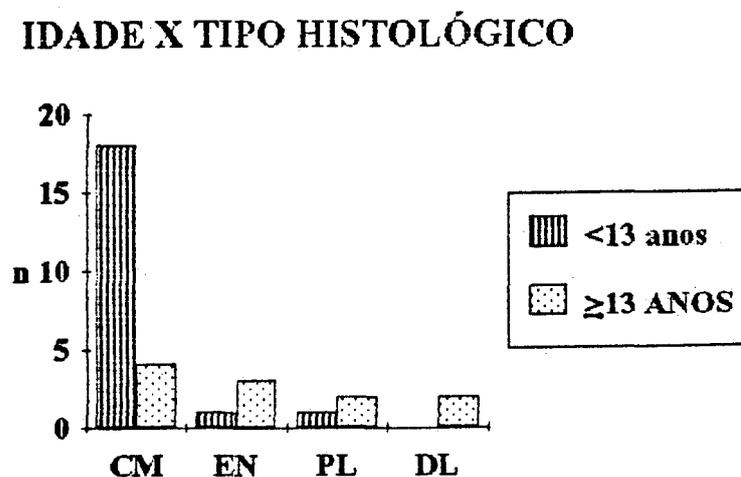
Em relação à extensão da doença (doença localizada X doença disseminada), observamos que 15 pacientes abaixo de 13 anos apresentavam doença localizada (estádio I/II) contra 3 pacientes acima de 13 anos. A análise estatística demonstra diferença significativa, onde se nota pacientes com idade abaixo de 13 anos apresentando doença localizada ($p < 0.0363$; teste exato de Fisher). (Figura 11)

FIGURA 11. ANÁLISE DA IDADE COM O ESTÁDIO CLÍNICO



Quanto ao histiotipo, 18 pacientes abaixo de 13 anos apresentavam o subtipo histológico celularidade mista, e 4 pacientes acima desta faixa etária. Esse dado foi estatisticamente significativo ($p < 0.0008$, teste exato de Fisher) (Fig 12). Em relação ao subtipo histológico esclerose nodular, 3 pacientes acima de 13 anos apresentavam este histiotipo e 1 paciente abaixo desta idade. Esse dado não teve diferença estatística ($p > 0.05$, teste exato de Fisher), porém deve ser ressaltado o pequeno número de pacientes neste grupo.

FIGURA 12 ANÁLISE DA IDADE COM O SUBTIPO HISTOLÓGICO

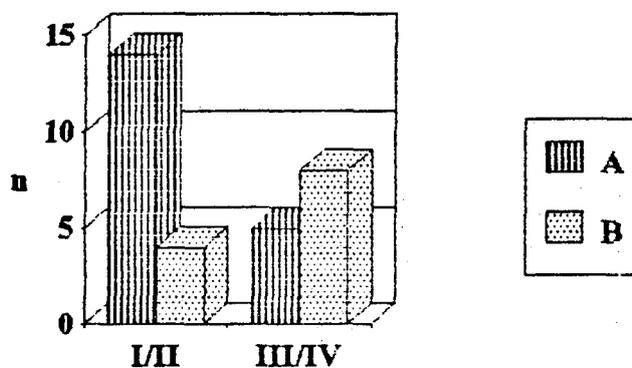


2.2 Estadiamento Clínico

Quando os estádios clínicos I/II e III/IV foram analisados quanto a sintomas A e B, observamos que 14 pacientes com doença localizada pertenciam ao grupo de sintoma A, enquanto que 4 pacientes, ao sintoma B. Esse dado é estatisticamente significativo ($p < 0.0324$; teste exato de Fisher.) (Figura 13). Demonstrando que pacientes com doença localizada (estádios I/II) tendem a pertencer ao grupo de sintomas A, definidos nos critérios de Ann Arbor.

FIGURA 13. ANÁLISE DO ESTÁDIO CLÍNICO COM SINTOMAS A e B

ESTÁDIO X SINTOMAS A e B

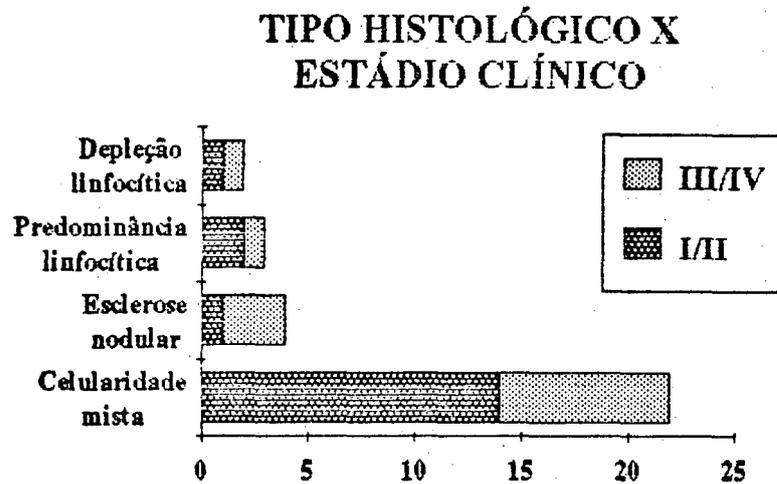


2.3 Histopatologia

O tipo histológico mais freqüente visto neste grupo em estudo foi a celularidade mista (CM), ocorrendo em 22/31 pacientes (70.97%). Este dado foi estatisticamente significativo ($p < 0.0097$; teste das proporções.). A distribuição dos subtipos histológicos nos estádios I/II e III/IV demonstra a presença do subtipo celularidade mista em todos os estádios, principalmente nos estádios I/II (14/22 cases). A esclerose nodular foi mais observada no estágio III. (Figura 14), porém a análise

estatística da correlação do tipo histológico com os estádios clínicos não pôde ser realizada pela pequena quantidade de casos.

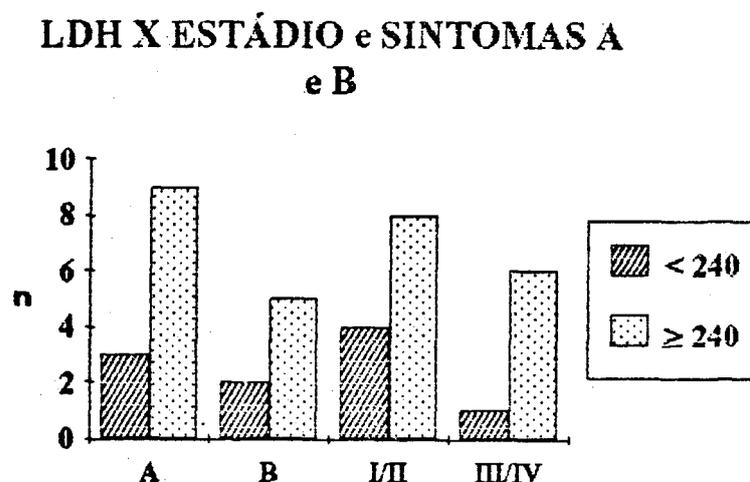
FIGURA 14. ANÁLISE DOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS COM ESTÁDIO CLÍNICO



2.4 Achados laboratoriais

Quando analisados os níveis de Desidrogenase Láctica (LDH) em relação ao grau de comprometimento tumoral (estádios I/II e III/IV), observamos que 8 pacientes com níveis de LDH maiores que 240 apresentavam estágio I/II, enquanto 6, estágio III/IV. Em relação aos sintomas A e B, 9 pacientes com sintoma A e 5 com sintoma B apresentavam os níveis de LDH maiores que 240. Não houve diferença estatística entre estes dados ($p > 0.05$; teste exato de Fisher)(Figura 15).

FIGURA 15. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE LDH COM ESTÁDIO CLÍNICO E SINTOMAS A e B



2.5 Linfócitos / Marcadores CD4 e CD8

Com o objetivo de verificar se a contagem absoluta de linfócitos está associada ao grau de comprometimento da doença (estádios I/II e III/IV) ou a sintomas A ou B, foi realizada uma comparação entre as médias dos casos separados por estadiamento e sintomas (A ou B).

A média de contagem linfocitária foi de $3.071 \pm 1.829 \text{ mm}^3$ (1.386 a 8.820) em 15 casos com doença localizada, enquanto foi de $1.777 \pm 680 \text{ mm}^3$ (474 a 2.480) em 10 casos com doença disseminada. Nos grupos de sintomas A e B com 18 e 12 pacientes respectivamente, a média de contagem linfocitária foi de $2.898 \pm 1.720 \text{ mm}^3$ (1.200 a 8.820) e 1.742 ± 952 (84 a 3552), respectivamente. Foi notado uma associação entre a contagem de linfócitos e os estádios clínicos I/II e III/IV , assim como entre os grupos com sintomas A e B ($p < 0.05$ teste "t de student"), sendo menor entre os grupos com estádios III/IV ($p < 0.044$) e sintomas B ($p < 0.043$). Estes dados estão na tabela 4.

TABELA 4. RELAÇÃO DO NÚMERO DE LINFÓCITOS COM O ESTÁDIO CLÍNICO E SINTOMAS A e B

	Linfócitos (mm³)	Pacientes (n)
*Estádio clínico		
I/II	1.386 - 8.820 (3.071 ± 1.829)	15
III/IV	474 - 2.480 (1.777 ± 680)	10
**Sintomas		
A	1.200 - 8.820 (2.898 ± 1.720)	18
B	84 - 3.552 (1.742 ± 952)	12

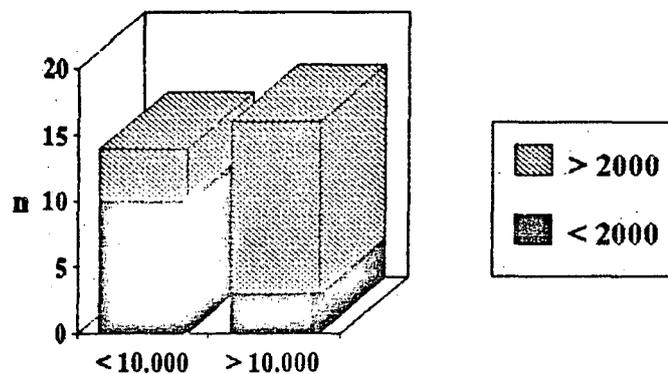
* p<0.044(teste t de student)

** p<0.043(teste t de student)

Para verificar se existia uma relação entre o número de leucócitos com o número de linfócitos no sangue periférico, foram analisados 30 pacientes os quais apresentavam uma média de $10.4 \times 10^3 \pm 4.05 \times 10^3/\text{ul}$ leucócitos e $2.436 \pm 1.552 \text{ mm}^3$ de linfócitos. Existe uma relação entre o número total de leucócitos com o número total de linfócitos no sangue periférico ($p < 0.0005$) (Figura 16).

FIGURA 16. RELAÇÃO ENTRE A CONTAGEM DE LEUCÓCITOS E LINFÓCITOS

LEUCÓCITOS X LINFÓCITOS



Com o objetivo de verificar se as subpopulações de células T (CD4 e CD8) relacionam-se ao grau de comprometimento da doença (estádio I/II e III/IV) e aos sintomas A e B, foram analisadas as médias dos grupos, como demonstrado na tabela 5. Esses grupos foram formados de 16 pacientes, pertencentes ao estágio I/II e 10 pacientes ao estágio III/IV, 17 pacientes com sintomas A e 9 pacientes com sintomas B. A distribuição dos subtipos de células T (CD4 e CD8) não demonstrou diferença significativa entre os pacientes com doença localizada ou disseminada ($p > 0.05$; teste exato de Fisher) assim como em relação à presença de sintomas A e B ($p > 0.05$; teste "t" de student).

TABELA 5. RELAÇÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS COM O ESTÁDIO CLÍNICO E SINTOMAS A e B

	ESTÁDIO CLÍNICO		SINTOMAS	
	* I / II	*III / IV	*A	*B
**CD4	40.17 ± 15.62 (14.0-78.0)	45.0 ± 17.99 (15.0-70.0)	43.58 ± 15.04 (14.0-78.0)	38.77 ± 20.01 (15.0-70.0)
**CD8	27.56 ± 11.23 (8.0-45.0)	26.3 ± 16.66 (7.0-61.0)	27.64 ± 10.79 (14.0-45.0)	26.0 ± 17.75 (7.0-61.0)
**CD4/CD8	1.87 ± 1.40 (0.41-5.6)	2.12 ± 1.04 (0.45-3.0)	1.98 ± 1.38 (0.41-5.6)	1.93 ± 1.06 (0.45-3.7)

*p>0.05(teste "t" de student)

** média ± desvio padrão

3. Evolução dos pacientes estudados

Embora o nosso estudo não se dispunha em avaliar a resposta terapêutica dos pacientes, observamos que 21 pacientes se encontram em remissão clínica contínua por um período de mais de um ano, dois apresentaram recidiva (um óbito), quatro abandonaram o tratamento, e de quatro pacientes não conseguimos informações precisas.

DISCUSSÃO

Os resultados do nosso estudo revelaram que não houve associação estatisticamente significativa entre as percentagens média dos linfócitos auxiliares (CD4) e supressores (CD8), assim como dos valores da relação CD4/CD8 com casos de Doença de Hodgkin segregados segundo o estágio da doença ou sintomas constitucionais da doença. Portanto, esses dados não corroboram a hipótese do estudo de que alterações numéricas das subpopulações CD4 e CD8 poderiam explicar, em parte, algumas das características clínicas e biológicas da Doença de Hodgkin observadas em nosso meio, tais como baixa idade ao diagnóstico e frequência aumentada do tipo histológico celularidade mista.

Além disso, as percentagens médias dos linfócitos CD4, CD8 e da relação CD4/CD8 dos pacientes estudados não diferem significativamente daquelas percentagens, encontradas em indivíduos normais e de idades semelhantes, utilizando o mesmo tipo de metodologia laboratorial.

Os resultados do presente estudo não estão de acordo com aqueles observados por Romagnani e cols.¹⁵⁷, que verificaram que a porcentagem média de linfócitos CD4 de 53 pacientes com Doença de Hodgkin e idade variando de 12 a 73 anos (mediana, 34 anos) foi significativamente menor, do que aquela de indivíduos considerados normais. O maior problema metodológico desse estudo é o de que a determinação da percentagem dos linfócitos CD4 foi realizada empregando o método de rosetas com eritrócitos bovinos sensibilizados com IgM, obtida de coelhos previamente imunizados com eritrócitos de mesma origem. Métodos, utilizando rosetas com eritrócitos, têm sido considerados de baixa sensibilidade em pacientes com Doença de Hodgkin, possivelmente devido a fatores solúveis bloqueadores, existentes no soro desses pacientes^{62,70,167}. Além disso, mais da metade dos casos estudados por Romagnani e

cols.¹⁵⁷ havia recebido radioterapia à qual poderia ter alterado a distribuição das subpopulações linfocitárias⁷¹.

Resultados semelhantes aos de Romagnani foram observados por Gupta⁸³ que comparou a distribuição de subpopulações linfocitárias de sangue periférico e de baço de 24 pacientes, com idades variando entre 18 e 52 anos, com a Doença de Hodgkin (22 casos com esclerose nodular e 2 casos com celularidade mista) previamente não tratados. Este autor verificou que no sangue periférico existia uma proporção comparável de linfócitos CD4, e um aumento significativo de linfócitos CD8 em relação a indivíduos sadios normais (controles), o que resultou em uma diminuição significativa da relação CD4/CD8. Foi também verificado que havia uma diminuição significativa da população linfocitária CD8 e um aumento da população linfocitária CD4, obtidos de tecido esplênico dos casos com Doença de Hodgkin em comparação com a distribuição dessas mesmas subpopulações, obtidas de tecido esplênico de indivíduos normais (os baços haviam sido removidos devido a trauma). Ainda em relação a população de linfócitos CD4, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre valores baixos dos linfócitos CD4 e casos com doença avançada. Da mesma forma que no estudo reportado por Romagnani e cols., a metodologia empregada por Gupta, para determinação das subpopulações CD4 e CD8, foi baseada na formação de rosetas com eritrócitos bovinos.

Em estudos publicados mais recentemente, empregando outras metodologias progressivamente mais específicas, incluindo a utilização de anticorpos monoclonais, os resultados observados previamente não têm sido confirmados. Lauria e cols.¹¹² verificaram que a distribuição de subpopulações linfocitárias de 26 pacientes com Doença de Hodgkin previamente não tratados, com idade variando entre 18 e 39 anos (mediana, 25 anos), era relativamente normal, e que exceto por uma moderada redução dos linfócitos CD4 não havia alteração da relação linfocitária CD4/CD8. Sete

pacientes nesse grupo possuíam tipo histológico celularidade mista e II, doença avançada ao diagnóstico. Contudo, os autores não fornecem dados sobre a possível associação entre parâmetros indicativos de mau prognóstico e as subpopulações linfocitárias. De interesse, esses autores verificaram que, após o término do tratamento, havia um aumento significativo das células CD8 e uma inversão dos valores da relação CD4/CD8.

Posner e cols.¹⁴⁵ reportaram os resultados de uma avaliação imunológica de 20 pacientes, cujas idades variaram de 10 a 47 anos (mediana, 21 anos). Neste estudo, os autores verificaram que, embora houvesse uma diminuição estatisticamente significativa do número total de linfócitos T em casos com sintomatologia constitucional, quando comparados com casos sem esses sintomas, não houve diferenças significativas em relação às subpopulações CD4 e CD8. Entretanto, os casos incluídos nesse estudo são aqueles típicos da Doença de Hodgkin ocorrendo em países desenvolvidos (Grupo III de Correa e O'Connor); 17 pacientes apresentavam o tipo histológico esclerose nodular, 10 deles com doença localizada, e idade média de 21 anos.

Embora existam evidências importantes de que a Doença de Hodgkin é acompanhada de alterações imunológicas no hospedeiro, os resultados das investigações realizadas não esclarecem se essa deficiência imunológica é decorrente da alteração de subpopulações celulares alteradas ou da secreção de substâncias como linfocinas e outras moléculas. Em pacientes com a síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), que desenvolvem a Doença de Hodgkin, as percentagens dos linfócitos CD4 são significativamente diminuídas¹⁸¹. De importância, esses pacientes geralmente apresentam estádios avançados da doença, tipos histológicos celularidade mista e depleção linfocítica e uma resposta muito pobre ao tratamento. É, portanto, possível que uma infecção prévia por um agente infeccioso alterasse a resposta imune,

como no caso da AIDS, estabelecendo condições para que outros eventos ocorressem levando à progressão neoplásica rápida. Contudo, nos casos da forma infantil da Doença de Hodgkin ocorrendo em nosso meio, que em muitos aspectos recapitula aquelas formas clínicas encontradas nos pacientes com AIDS, o nosso estudo não demonstrou que as alterações imunológicas classicamente descritas naquela síndrome estivessem significativamente associadas com os casos estudados. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas das percentagens de CD4 e CD8 entre os casos segregados por estadiamento ou sintomas. Esses dados sugerem que outros mecanismos, imunológicos ou não, estejam envolvidos na fisiopatogenia da Doença de Hodgkin em nosso meio.

É importante salientar, que houve uma associação, estatisticamente significativa, entre a redução absoluta da contagem linfocitária nos estádios avançados da doença e sintomas B. Desde que a relação entre as populações CD4 e CD8 apresentou resultados dentro dos limites da normalidade, a diminuição absoluta dos linfócitos mais provavelmente representa uma diminuição proporcional das duas subpopulações. Esse achado é compatível com a presença de fatores séricos que interferissem com a produção ou reatividade dos linfócitos. Fuks e cols.⁷⁰ descreveram que pacientes com Doença de Hodgkin possuem fatores solúveis, que interferem com a capacidade das células T formarem rosetas com eritrócitos de carneiro. Quando os linfócitos são cultivados em meio contendo soro de feto bovino, eles recuperam a capacidade de formação de roseta, sugerindo que exista uma interação entre fatores séricos e receptores nas células T, que são adsorvidos durante o processo de incubação com soro fetal bovino. Em outro estudo, Grifoni e cols.⁷⁸ demonstraram a presença de anticorpos contra linfócitos presentes, tanto em linfonodos como no sangue. Entretanto, outros estudos não comprovaram que os fatores inibidores dos linfócitos na Doença de Hodgkin fossem da fração imunoglobulínica do soro⁷⁰.

A descoberta das linfocinas (IL)⁷⁴, dos receptores celulares que interagem com essas linfocinas e que são secretados na circulação^{67,68,163}, e de outras moléculas com propriedades imunossupressoras, tem permitido a análise de uma nova dimensão na fisiopatologia da Doença de Hodgkin. Algumas das manifestações clínicas, associadas com Doença de Hodgkin, tais como febre prolongada, perda de peso crônica e sudorese, sugerem que existe uma atividade inflamatória constante. Algumas das manifestações clínicas são também encontradas em pacientes recebendo citocinas terapêuticamente. Por exemplo, IL-1 quando administrada em pacientes produz febre, hipotensão e linfopenia. Outras linfocinas, incluindo o fator de necrose tumoral, também produzem efeitos semelhantes.

Muitos investigadores demonstraram uma diminuição da produção de IL-2 pelos linfócitos obtidos de pacientes com Doença de Hodgkin^{63,64}. Em um desses estudos a severidade do defeito em produzir IL-2 foi diretamente correlacionado com a severidade da anergia cutânea. Outro achado recentemente revelado, com possível importância para o entendimento da Doença de Hodgkin, foi a descoberta de que a célula de Reed-Stenberg secreta uma série de citocinas que induzem uma forte resposta inflamatória⁵³.

Os dados do presente estudo e da revisão da literatura convidam à especulação de que as manifestações clínicas e imunológicas da Doença de Hodgkin sejam secundárias à produção, pelas células malignas (Reed-Stenberg e de Hodgkin) de linfocinas ou outras moléculas com propriedade imunossupressoras. Nesse contexto, as alterações da imunidade celular verificadas nesses pacientes são secundárias a essas alterações.

Com relação às manifestações clínicas dos casos, os resultados do presente estudo são paralelos com as observações anteriores realizadas no Brasil, de que o tipo

epidemiológico I de Correa e O'Connor predomina em nosso meio^{6,44}. A faixa etária dos pacientes registrados nesse trabalho é de 10 anos, a qual é muito mais baixa do que aquela verificada nos Estados Unidos^{65,120} e Inglaterra⁴³, e semelhante àquela descrita para os países subdesenvolvidos^{8,46,113,177}. Da mesma forma, o tipo histológico predominante foi o da celularidade mista, fato que não é observado nos países desenvolvidos, aonde existe uma predominância do tipo histológico esclerose nodular^{131,183}.

De importância, foi observado que as crianças, com menos de 13 anos de idade, possuíam padrões de apresentação clínica dissimilar daquelas acima dessa idade. Massa no mediastino, avaliada por radiografia simples do tórax e/ ou tomografia, foi documentada em mais de 70% dos casos acima de 13 anos, e em apenas 15% daqueles abaixo dessa idade. Linfonomegalia periférica sem concomitante massa do mediastino foi a manifestação clínica mais comum (80%) dos casos, com menos de 13 anos. Outra diferença, entre esses dois grupos etários, foi a tendência das crianças abaixo de 13 anos terem mais doença localizada e apresentarem com maior frequência o subtipo histológico celularidade mista.

Essa diferença de envolvimento anatômico e tipos histológicos, observada em casos segregados por idade, possui implicações com respeito à etiologia e possivelmente para o tratamento dessa doença. Como foi sugerido anteriormente por Cole e cols.⁴⁰, e posteriormente por Gutenson^{84,87} há indicações de que pelo menos dois processos etiológicos existem para a Doença de Hodgkin. O primeiro processo ocorrendo predominantemente em indivíduos jovens e desencadeado por uma infecção viral; e o segundo mecanismo seria comum às outras formas de linfomas ocorrendo em indivíduos acima de 45 anos.

Essa hipótese foi baseada na curva de distribuição dos casos de Doença de Hodgkin em relação à idade e às regiões geopolíticas. Nos países desenvolvidos, a distribuição dos casos nas diferentes idades apresenta dois picos de maior incidência: o primeiro ocorrendo entre 18 e 20 anos de idade, e o segundo entre as idades de 60 e 65 anos. Nos países subdesenvolvidos, existe uma diminuição da incidência global da doença na faixa etária abaixo de 45 anos, um achatamento do primeiro pico, e uma maior proporção de casos de Doença de Hodgkin com idade inferior a 18 anos.

Devido à distribuição epidemiológica da Doença de Hodgkin ser similar àquela da poliomielite antes da disponibilidade da vacina, muitos investigadores^{86,87,120,176} sugeriram que a Doença de Hodgkin em indivíduos jovens (abaixo de 45 anos) seria desencadeada por um agente infeccioso de grande contagiosidade, mas de baixo potencial oncogênico para as crianças de baixa idade, e que essa oncogenicidade aumentaria progressivamente com a idade do paciente. Em populações de condições sócio-econômicas desfavoráveis, as crianças de baixa idade adquiririam a virose, porém apenas uma proporção pequena delas desenvolveriam a doença (devido à baixa oncogenicidade do vírus nessa idade), explicando a diminuição global da doença nessas regiões; enquanto que nas regiões desenvolvidas, uma proporção maior de crianças chegaria à idade adulta sem imunidade ao vírus, e devido à oncogenicidade aumentada do vírus para o adulto jovem, seria observada uma maior incidência da doença e um pico em torno da idade em que houvesse maior exposição dos casos ao vírus.

Embora essa teoria tenha sido amplamente aceita, explicando a distribuição bimodal da doença, e o aumento da incidência da doença que ocorre paralelamente com a melhoria das condições sócio-econômicas, e o isolamento das crianças (famílias menos numerosas), ela não pode ser usada como uma explicação para as diferenças clínicas verificadas nos casos descritos no presente estudo. Baseada nesses resultados

e de informação recente da literatura, propomos que a Doença de Hodgkin na criança abaixo de 13 anos, é uma entidade clínica própria e possivelmente com fatores etiológico(s) e prognósticos distintos, daqueles observados na Doença de Hodgkin da criança mais velha e do adulto jovem. Nesse sentido, Ambider e cols.⁵ estudaram 36 casos com Doença de Hodgkin, sendo 11 de Honduras e 25 dos Estados Unidos. Estes autores verificaram que as biópsias do tecido tumoral dos 11 casos de Honduras possuíam o genoma do vírus do Epstein-Barr, enquanto que apenas 9 dos 26 casos norte-americanos estudados possuíam esse achado. De maior interesse, foi que dos 7 casos norte-americanos com histologia celularidade mista, 6 deles continham o genoma do vírus Epstein-Barr e 3 casos de Honduras, que eram de histologia esclerose nodular, possuíam o vírus. Outro estudo realizado por Jarrett e cols.¹⁰¹ corrobora a hipótese que os fatores etiológicos diferentes poderiam existir para Doença de Hodgkin dependendo da idade do paciente. Nesse estudo, foi verificado que 71% dos tumores de pacientes acima de 50 anos, 54% daqueles abaixo de 15 anos e aproximadamente 15% daqueles entre 15 e 50 anos, continham o DNA do vírus de Epstein-Barr, respectivamente.

Alternativamente, espécies diversas do mesmo vírus poderiam estar envolvidos na fisiopatologia da Doença de Hodgkin de diferentes idades. No hospital St. Jude, Sixbey e cols.¹⁷³ usando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstraram que duas espécies diferentes do vírus do Epstein-Barr (denominados de A e B) eram obtidas em lavados de orofaringe de indivíduos adultos normais. Nesse estudo, 41% dos casos estudados eliminavam o vírus do tipo B, enquanto que 50%, o tipo A. Apenas 9% possuíam a presença dos dois vírus, sugerindo que a infecção por uma espécie confere imunidade a outra espécie. Outro estudo mostrou que o vírus Epstein-Barr tipo B, pode ser detectado 6 vezes mais freqüentemente do sangue de pacientes com AIDS, do que de sangue de controles normais, sugerindo que uma alteração imunológica significativa, como aquela presente em pacientes com

AIDS, poderia permitir a expressão sistêmica desse vírus. Nos estudos realizados em adultos e crianças com Doença de Hodgkin, independentemente da região geográfica, o vírus encontrado nas biópsias dos tumores foi do tipo A⁷⁶. É possível que a variabilidade clínica observada entre pacientes com Doença de Hodgkin poderia ser explicada pelo agente etiológico envolvido nessa doença. Em pacientes com a forma histológica celularidade mista, as evidências de que o vírus de Epstein-Barr participa da fisiopatogenia da doença são bastante fortes^{26,92,133,138}. Estudos estão em progresso para comparar a frequência do genoma do vírus de Epstein-Barr em material tumoral de crianças brasileiras com aquela de crianças norte-americanas.

A consequência mais importante da separação dos casos da Doença de Hodgkin em grupos, em função da presença ou ausência do genoma do vírus de Epstein-Barr no material tumoral, é a possibilidade de estabelecer tratamento individualizado para esses grupos. Como está amplamente documentado, o linfoma de Burkitt, endêmico na África, também contém o genoma do vírus do Epstein-Barr no infiltrado tumoral²⁰⁴. Pacientes com esse tipo de tumor são altamente curáveis muitas vezes com o uso de uma droga isolada, a ciclofosfamida. O mesmo tipo histológico de tumor, esporadicamente encontrado nos Estados Unidos e Europa (tumor de Burkitt não endêmico), não possui nas células tumorais a presença do genoma do Epstein-Barr e possui uma resistência muito maior à quimioterapia²².

O presente estudo, embora não tenha sido elaborado com o objetivo de avaliar sobrevida livre de doença dos pacientes, foi observado que das 20 crianças abaixo de 13 anos, 18 possuem seguimento adequado, e dessas 16 estão vivas e livres de doença. Se os estudos em andamento, em conjunto com o Hospital St. Jude, mostrarem que a presença do vírus de Epstein-Barr confere um melhor prognóstico aos pacientes, uma diminuição da intensidade do tratamento para esse grupo de doentes deverá ser avaliada.

CONCLUSÕES

Os resultados desta investigação em pacientes abaixo de 22 anos com Doença de Hodgkin, revelaram que não há diferença significativa entre as percentagens médias dos linfócitos CD4 e CD8 e o estadiamento da doença, ou a sintomatologia clínica.

Houve uma associação estatisticamente significativa entre a linfopenia absoluta e estádios avançados da doença e a presença de sintomas. Essa diminuição é aparentemente devida a uma diminuição proporcional dos linfócitos CD4 e CD8.

O subtipo histológico celularidade mista foi o mais freqüente entre os pacientes estudados. Esse achado concorda com aquele relatado na literatura nacional e na de países subdesenvolvidos, em que existe uma predominância desse histiotipo entre pacientes jovens.

Houve diferença estatisticamente significativa entre as formas de apresentação clínica dos casos segregados por idade. A linfonodomegalia periférica, doença localizada e o tipo histológico celularidade mista foram associados com criança abaixo de 13 anos, enquanto massa de mediastino à pacientes acima dessa idade.

ANEXO 1. IDADE, SEXO, DURAÇÃO DOS SINTOMAS (meses), SINAIS E SINTOMAS, INFILTRAÇÃO DE MO, AVALIAÇÃO DE IMAGEM DOS PACIENTES COM DOENÇA DE HODGKIN

PACIENTE	IDADE/ SEXO	DURAÇÃO SINTOMAS	SINAIS/SINTOMAS AO DIAGNÓSTICO	INFILTRAÇÃO DE MO	AVALIAÇÃO DE IMAGEM
01	6/M	—	Febre, Perda de Peso, Astenia	Não	Hepatoesplenomegalia
02	19/M	06	Linfonomegalia Cervical	Não	Massa Mediastinal, Nódulo Pulmonar, Derrame Pleural
03	05/M	03	Linfonomegalia Cervical	Não	Normal
04	21/M	06	Linfonomegalia Cervical, Astenia, Perda de peso	Não	Alargamento de Mediastino
05	12/M	03	Linfonomegalia Cervical	Não	Normal
06	07/M	24	Febre, Perda de Peso, Astenia	Não	Adenomegalia Retroperitoneal
07	16/M	12	Linfonomegalia Cervical	Não	Normal
08	08/M	—	Linfonomegalia Inguinal	Não	Normal
09	08/M	06	Linfonomegalia Cervical	Não	Normal
10	04/M	12	Linfonomegalia Cervical	Não	Normal
11	03/M	03	Linfonomegalia Cervical e Axilar	Não	Normal
12	11/M	08	Icterícia, Perda de Peso	Não	Adenomegalias Retroperitoneais
13	04/M	09	Linfonomegalia Cervical	Não	Normal
14	07/M	01	Linfonomegalia Cervical e Supraclavicular	Não	Normal
15	09/F	01	Infeção Pulmonar	Não	Massa Mediastinal, Hepatoesplenomegalia
16	07/M	05	Linfonomegalia Cervical, Supraclavicular, Febre	Não	Normal
17	12/F	04	Perda de Peso, Sudorese Noturna, Linfonomegalia	Não	Adenomegalia Retroperitoneal
18	19/F	—	Cansaço	Não	Alargamento de Mediastino

19	22/M	06	Febre, Perda de Peso, Linfonodomegalia Cervical	Sim	Adenomegalias Mediastinal Derrame Pleural, Hepatoesplenomegalia Adenomegalias retro- peritoneais
20	16/M	06	Linfonodomegalia Inguinal	Não	Adenomegalia Mediastinal, aumento de cadeia ilíaca externa e interna.
21	14/F	04	Febre, Perda de Peso, Linfonodomegalia Cervical	Não	Adenomegalia Mediastinal, Retroperitoneal, Esplenomegalia
22	08/F	06	Linfonodomegalia Cervical e Supraclavicular Esquerda	Não	Normal
23	10/M	24	Febre, Perda de peso, Astenia, Anorexia	Não	Massa Mediastinal, Adenomegalias Retro- peritoneais, Nódulos Hipoecóicos no Baço.
24	07/M	03	Linfonodomegalia Inguinal Esquerda	Não	Linfonodomegalia Ilíaca e Mesentérica
25	16/F	01	Linfonodomegalia Cervical	Não	Alargamento de Me- diastino, Nódulo hepá- tico e Esplênico
26	10/F	02	Febre, Perda de Peso	Não	Massa Retroperitoneal, Nódulos Hipoecóicos Paraórtico
27	13/F	03	Febre, Astenia, Linfonodomegalia	Não	Linfonodomegalia Me- diastinal e retroperito- neal, nódulos Esplêni- cos
28	08/M	07	Tosse, Cansaço, Falta de ar	Não	Massa mediastinal, Imagens Hipoecóicas em Hilo Esplênico
29	06/M	01	Linfonodomegalia Cervical Direita	Não	Normal
30	14/M	05	Massa Abdominal	Não	Massa Retroperitoneal
31	07/F	10	Linfonodomegalia Cervical Direita	Não	Normal

ANEXO 2. VALORES HEMATIMÉTRICOS

Pctes (n)	Hb (g/dl)	Hct (%)(x10 ³ /mm ³)	Leuc. (%)	Bt (%)	Seg (%)	Lt (%)	Mo (%)	Eo (%)	Ba (%)	Plaq. (x 10 ³ /mm ³)	VHS (1 ^a h)
01	----	33	3.8	11	62	17	09	01	—	470	—
02	11.6	34	13.3	20	64	14	02	—	—	445	13
03	14.9	44	6.1	15	50	29	06	—	—	330	05
04	13.5	41.1	8.2	05	62	20	09	03	01	450	—
05	12.6	38	8.5	02	47	28	03	20	—	220	31
06	11.4	38	11.8	06	60	17	04	13	—	675	—
07	15.0	43.8	—	01	55	31	01	12	—	255	05
08	11.3	35	11.0	57	36	—	07	—	—	—	—
09	12.0	36	9.6	03	55	32	04	06	—	240	42
10	11.8	38	8.1	21	48	23	08	—	—	310	05
11	9.8	30	14.7	03	23	60	04	10	—	190	54
12	12.4	38	14.8	14	51	24	08	03	—	223	50
13	10.4	33	14.1	06	46	23	06	19	—	340	—
14	13.2	40	9.8	03	45	38	06	08	—	380	115
15	8.0	27.1	11.7	20	60	17	01	02	—	225	115
16	9.9	33.3	8.1	01	62	21	09	07	—	500	115
17	10.0	32.7	19.1	01	84	11	03	01	—	762	11
18	11.1	34.2	9.9	17	58	14	05	06	—	330	47
19	7.7	24.6	2.1	11	30	04	04	01	—	300	—
20	14.5	43	7.3	01	61	25	06	07	—	—	43
21	—	27	7.9	26	54	06	13	01	—	345	130
22	11.7	37	19.6	22	55	15	08	—	—	420	—
23	8.5	28	11.7	—	43	21	08	29	—	846	35
24	13.0	29.6	6.6	11	24	54	02	07	02	590	05
25	9.7	31.5	12.4	03	47	20	04	01	—	—	32
26	9.3	31.4	11.3	03	64	19	08	05	01	509	57
27	9.3	31	14.0	09	70	16	02	03	—	515	58
28	8.8	27	6.0	02	74	20	02	01	—	380	70
29	10.9	33.4	8.3	18	45	25	10	01	01	508	42
30	13.0	—	6.9	08	52	28	09	03	—	275	—
31	9.3	28	14.1	08	62	26	04	—	—	311	45

ANEXO 3. VALORES BIOQUÍMICOS

Pctes (n)	TGO (U/L)	TGP (U/L)	FA (U/L)	Ur (mg%)	Cr (mg%)	BD (mg%)	BI (mg%)	BT (mg%)	MUCO (mg%)	LDH (U/L)
01	29	19	587	39	0.66	1.30	0.91	2.21	—	—
02	22	10	280	38.5	0.8	0.22	0.60	0.82	12.7	—
03	55	44	—	22.1	0.85	—	—	—	—	—
04	10	50	156	26	0.9	—	—	—	6.8	—
05	23	07	—	15	0.6	—	—	—	1.9	—
06	07	05	209	18	0.6	—	—	—	—	—
07	10	05	247	28	0.6	—	—	—	6.4	176
08	12	19	6.5	20	0.5	0.5	0.5	1.0	—	340
09	60	92	9.8	30	0.83	1.4	0.48	1.88	—	418
10	35	16	—	30	0.87	—	—	—	5.6	100
11	24	21	—	23	0.68	0.5	0.32	0.82	—	418
12	27	23	—	24	0.77	0.8	0.32	1.12	5.8	288
13	—	—	—	—	—	—	—	—	—	190
14	28	17	—	16	0.3	—	—	—	—	—
15	—	—	—	16	0.3	—	—	—	—	290
16	10	12	347	—	—	—	—	—	—	—
17	05	06	261	25	0.8	—	—	—	—	280
18	02	04	267	33	1.1	—	—	—	—	262
19	25	13	343	02	0.4	0.33	0.57	0.9	197	—
20	06	06	61	27	0.6	—	—	—	—	473
21	38	22	128	33	0.8	—	—	—	—	412
22	46	28	—	26	0.63	—	—	—	—	338
23	09	06	722	12	0.5	0.24	0.48	0.72	18.3	260
24	11	07	—	26	0.5	0.1	0.6	0.7	—	261
25	—	—	90	—	—	—	—	—	—	—
26	05	07	—	21	0.6	0.2	0.6	0.8	—	214
27	18	17	248	12	0.8	0.1	0.6	0.7	—	339
28	06	06	354	21	0.7	—	—	—	—	—
29	30	21	—	14	0.6	—	—	—	7.5	—
30	17	17	—	33	0.83	—	—	—	—	244
31	16	11	7.4	22	0.73	0.60	0.33	0.93	—	246

ANEXO 4. TIPO HISTOLÓGICO, SINTOMAS, ESTÁDIO CLÍNICO, NÚMERO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS

Pctes (n)	TIPO HISTOLÓGICO	SINTOMAS	ESTÁDIO	LINFÓCITOS (mm ³)
01	CM	B	IV	646
02	CM	B	IV	1862
03	CM	A	I	1769
04	DL	B	II	1640
05	CM	A	I	2380
06	CM	B	III	2006
07	PL	A	I	—
08	CM	A	I	4248
09	CM	A	I	3072
10	CM	A	II	1863
11	CM	A	II	8820
12	CM	B	II	3552
13	CM	A	II	3243
14	EN	A	II	3724
15	CM	A	III	1989
16	CM	B	II	1701
17	CM	B	III	2101
18	CM	A	II	1386
19	DL	B	IV	84
20	CM	A	III	1825
21	EN	B	III	474
22	CM	A	II	2940
23	CM	B	IV	2457
24	PL	A	II	3564
25	EN	A	III	2480
26	CM	B	II	2147
27	EN	B	III	2240
28	CM	A	III	1200
29	CM	A	I	2075
30	PL	A	III	1932
31	CM	A	I	3666

**ANEXO 5. MARCADORES IMUNOLÓGICOS,
NÚMERO ABSOLUTO DE LINFÓCITOS**

Pctes	CD4	CD8	CD4/ CD8	CD2	CD3	CD7	CD19	Lt
(n)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(/mm ³)
01	67	43	1.5:1	65	53	—	—	646
02	70	22	3:1	20	84	—	—	1862
03	40	42	1:1	78	82	—	—	1769
04	30	08	3.7:1	<1	35	—	—	1640
05	47	26	1.8:1	51	55	—	—	2380
06	27	61	1:2.2	86	82	—	—	2006
07	14	34	1:2.4	57	—	45	3	—
08	56	36	1.5:1	—	61	—	25	4248
09	78	14	5.6:1	85	50	82	15	3072
10	41	33	1.2:1	89	59	91	3	1863
11	33	43	1:1.3	83	71	79	10	8820
12	32	17	1.9:1	72	30	85	14	3552
13	53	17	3:1	83	63	73	6	3243
14	52	34	1.5:1	62	25	54	12	3724
15	38	34	1:1	72	74	79	2	1989
16	18	27	1:1.5	50	40	46	9	1701
17	38	14	2.7:1	—	—	—	—	2101
18	46	27	1.7:1	—	—	—	—	1386
19	—	—	—	—	—	—	—	—
20	42	16	2.6:1	65	60	—	—	1825
21	15	07	2:1	20	11	—	7	747
22	32	45	1:1.4	71	68	85	5	2940
23	52	35	1.5:1	85	—	80	9	2457
24	—	—	—	—	—	—	—	—
25	37	15	2.5:1	—	—	—	—	2480
26	43	—	—	—	70	—	17	—
27	—	—	—	—	—	—	—	—
28	—	—	—	—	—	—	—	—
29	22	22	1:1	58	37	62	4	2075
30	64	16	4:1	—	62	45	12	1932
31	46	16	3.5:1	62	54	—	7	3666

**ANEXO 6. DISTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS
E NÚMERO DE LINFÓCITOS NOS ESTÁDIOS CLÍNICOS**

Pacientes (n)	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8	linfócitos (/mm ³)
I/II					
03	82	40	42	1.0	1769
05	55	47	26	1.8	2380
08	61	56	36	1.5	4248
09	50	78	14	5.6	3072
10	59	41	33	1.2	1863
11	71	33	43	0.76	8820
12	30	32	17	1.9	3552
13	63	53	17	3.0	3243
18	--	46	27	1.7	1386
22	68	32	45	0.71	2940
29	37	22	22	1.0	2075
14	25	52	34	1.5	3724
04	35	30	8	3.7	1640
07	--	14	34	0.41	--
16	40	18	27	0.66	1701
31	54	46	16	3.5	3666
III/IV					
01	53	67	43	1.5	646
02	84	70	22	3.0	1862
06	82	27	61	0.45	2006
17	--	38	14	2.7	2101
20	60	42	16	2.6	1825
23	--	52	35	1.5	2457
21	11	15	07	2.0	474
15	74	38	34	1.0	1989
25	--	37	15	2.5	2480
30	62	64	16	4.0	1932

ANEXO 7. DISTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM RELAÇÃO AOS SINTOMAS A e B

Paciente (n)	CD3 (%)	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8	Lt (mm ³)
A					
03	82	40	42	1.0	1769
05	55	47	26	1.8	2380
08	61	56	36	1.5	4248
09	50	78	14	5.6	3072
10	59	41	33	1.2	1863
11	71	33	43	0.76	8820
13	63	53	17	3.0	3243
18	--	46	27	1.7	1386
20	60	42	16	2.6	1825
22	68	32	45	0.71	2940
28	--	--	--	--	1200
29	37	22	22	1.0	2075
31	54	46	16	3.5	3666
14	25	52	34	1.5	3724
15	74	38	34	1.0	1989
25	--	37	15	2.5	2480
07	--	14	34	0.41	--
24	--	--	--	--	--
30	62	64	16	4.0	1932
B					
01	53	67	43	1.5	646
02	84	70	22	3.0	1862
06	82	27	61	0.45	2006
12	30	32	17	1.9	3552
17	--	38	14	2.7	2101
23	--	52	35	1.5	2457
26	--	--	--	--	--
21	11	15	07	2.0	474
27	--	--	--	--	--
04	35	30	08	3.7	1640
19	--	--	--	--	--
16	40	18	27	0.66	1701

ANEXO 8. FICHA DE COLETA DE DADOS

NOME DO PACIENTE : _____

INSTITUIÇÃO : _____

SEXO Masculino() Feminino()

IDADE : _____

DATA DO DIAGNÓSTICO : _____

ESTADIAMENTO CLÍNICO : _____

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO : _____

HISTÓRIA CLÍNICA :

- História familiar de Doença de Hodgkin SIM () NÃO ()

- Doenças Auto-Imune SIM () NÃO ()

- Mononucleose Infecciosa SIM () NÃO ()

- Uso de drogas anticonvulsivantes/hidantoinatos

SIM () Especificar : _____

NÃO ()

- Febre de origem indeterminada SIM () NÃO ()

Duração : _____

- Sudorese noturna Moderada ()

Intensa ()

Sem sudorese noturna ()

- Prurido SIM () - Intensidade : _____

NÃO ()

- Perda de peso SIM () Quantidade/Duração : _____

NÃO ()

- Febre ()
- Perda de peso ()
- Sudorese noturna()
- Astenia ()
- Outras _____
- Linfonodomegalias ()
- Hepatomegalia ()
- Esplenomegalia ()
- Anorexia ()

EXAME FÍSICO

- Linfonodomegalias

	Localização	Tamanho	Características
SIM	() Cervical	_____	_____
	() Supraclavicular	_____	_____
	() Axilar	_____	_____
	() EpitrocLEAR	_____	_____
	() Mediastinal	_____	_____
	() Abdominal	_____	_____
	() Inguinal	_____	_____
	() poplíteo	_____	_____
NÃO	()		

- Baço Normal ()
 Aumentado () Tamanho _____
 Consistência _____

- Fígado Normal ()
 Aumentado () Tamanho _____
 Consistência _____

- Dor óssea SIM () Local _____
 NÃO ()

EXAMES DE IMAGEM

Raio X de tórax:

Tomografia abdominal e/ou torácica:

Ecografia abdominal:

Linfografia:

EXAMES LABORATORIAIS

Hemograma:

Ht _____

Hb _____

Leucócitos _____

- diferencial

Bastonetes _____

Segmentados _____

Linfócitos _____

Monócitos _____

Eosinófilos _____

Basófilos _____

Plaquetas _____

Vhs _____

TGO _____

TGP _____

Fosfatase alcalina _____

Uréia _____

Creatinina _____

MARCADORES DE MEMBRANA DE LINFÓCITOS T

(%)

CD2_____

CD3_____

CD4_____

CD8_____

Outros_____

1. AGNARSSON, B. A. ; KADIN, M. E. The Immunophenotype of Reed- Sternberg Cels **Cancer**, London, v. 63, p. 2083- 2087, 1989.
2. AISENBERG, A. C. ; LESKOWITZ, S. Antibody formation in Hodgkin's disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 6, p. 1269- 1272, 1963.
3. AISENBERG, A. C. Hodgkin's disease-prognosis, treatment and etiologic and immunologic considerations. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 270, p. 508- 514, 1964.
4. AISENBERG, A. C. Studies on delayed hypersensitivity in Hodgkin's disease. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 41, p. 1964- 1970, 1962.
5. AMBINDER, R. F. ; BROWNING, P. J. ; LOREZANA, I. ; LEVENTHAL, B. G. ; COSENZA, H. ; MANN, R. B. ; MacMAHON, E. M. E. ; MEDINA, R. ; CARDONA, V. ; GRUFFERMAN, S. ; OLSHAN, A. ; LEVIN, A. ; PERTENSEN, E. A. ; BLATTNER, W. ; LEVINE, P. H. Epstein-Barr Virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States **Blood**, New York, v. 81, n. 2, p.462- 467, 1993.
6. ARANEGA, V. L. ; BRANDALISE, S. R. ; MATSUDA, E. ; BARUZZI, M. DJ. Childhood Hodgkin's disease. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, New York , v. 13, n. 3, p. 368, 1991.
7. ARPELS, C. ; SOUTHAM, C. M. Citotoxicity of ser from healthy persons and cancer patients. **Int. J. Cancer**, New York, v. 4, p. 548- 559, 1969.
8. AZZAM, S. A. High Incidence of Hodgkin's disease in chindren in Lebanon. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 26, p. 1202-1203, 1966.
9. BANKS, P. M. The Pathology of Hodgkin's disease. **Semin. Oncol.**, New York, v. 17, p. 683- 695, 1990.
10. BERKE, G. Functions and mechanisms of lysis induced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells **Fundamental Immunology**, Second edition, New York, chapter. 27, p. 735- 764, 1989.
11. BJÖRKHOLM, M. ; HOLM, G. ; MELLSTEDT, H. Immunologic profile of patientes with cured Hodgkin's disease. **Scand. J. Haematol.**, Copenhagen, v. 18, p. 361- 368, 1977.

12. BJÖRKHOLM, M. ; HOLM, G. ;FAIRE, V ; MELLSTED, H. Immunological defects in Healthy Twin siblings to patients with Hodgkin's disease. *Scand. J. Haematol.*, Copenhagen, v. 19, p. 396- 404, 1977.(221)
13. BJÖRKHOLM, M. ; ASKERGREN, J. ; HOLM, G. ; MELLSTEDT, H. Long-term influence of splenectomy on immune functions in patients with Hodgkin's disease. *Scand. J. Haematol.*, Copenhagen, v. 24, p. 87- 94, 1980.
14. BJÖRKHOLM, M. ; HOLM, G. ; MELLSTEDT, H. Immunologic profile of patients with cured Hodgkin's disease. *Scand. J. Haematol.*, Basel, v. 18, p. 361- 368, 1977.
15. BJÖRKHOLM, M. ; HOLM, G. ; MELLSTEDT, H. Immunological family studies in Hodgkin's disease-Is the immunodeficiency horizontally transmitted. *Scand. J. Haematol.*, COPENHAGEN, v. 20, p. 297- 305, 1978.
16. BJÖRKHOLM, M. ; HOLM, G. ; MELLSTEDT, H. ; JOHANSSON, B. Immunodeficiency and prognosis in Hodgkin's disease. *Acta. Med. Scand.*, Stockholm, v. 198, p. 275- 279, 1975.
17. BJÖRKHOLM, M. ; HOLM, G. ; MELLSTEDT, H. ; JOHANSSON, B. ; KILLANDER, D. ET. AL. Prognostic factors in hodgkin's disease-Role of the lymphocyte defect. *Scand. J. Haematol.*, Copenhagen, v. 20, p. 306- 318, 1978.
18. BJÖRKHOLM, M. ; WEDELIN, C. ; HOLM, G. ; JOHANSSON, B. ; MELLSTEDT, H. Longitudinal studies of blood lymphocyte capacity in Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 48, p. 2010-2015, 1981.
19. BJÖRKHOLM, M. ; WEDELIN, C. ; HOLM, G. ; OGENSTAD, S. ; JOHANSSON, B. ; MELLSTEDT, H. Immune status of untreated patients with Hodgkin's disease and prognosis. *Cancer*, Philadelphia, v. 66, p. 701- 709, 1982.
20. BOBROVE, A. M. ; FUKS, Z. ; STROBER, S. ; KAPLAN, H. S. Quantitation of T and B lymphocytes and cellular immune function in Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 36, p. 169- 179, 1975.
21. BONADONNA, G. ; ZUCALI, R. ; MONFARDINE, S. ; DE LENA, M. ; USLECNGHI, C. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with Adramycin, Bleomycin, Vinblastine, and Imidazole Carboxamide versus MOOP *Cancer*, Philadelphia, v. 36, p. 252- 259, 1975.
22. BOUFFET, E. ; FRAPPAZ, D. ; PINKERTON, R. ; FAVROT, M. ; PHILIP, T Burkitt's Lymphoma: a model for Clinical Oncology *Eur. J. Cancer*, Oxford, v. 27, n. 4, p. 504- 509. 1991.

23. BOWERS, T. K. ; MOLDOW, C. F. ; BLOOMFIELD, C. D. ; YUNIS, E. J. Familial Hodgkin's disease and the Major Histocompatibility Complex. *Vox. Sang.*, Basel, v. 33, p. 273- 277, 1977.
24. BOYLE, M. J. ; VASAK, E. ; TSCHUCHNIGG, M. ; TUNER, J. J. ; SCULLEY, T. ; PENNY, R. ; COOPER, D. A. ; TINDAL, B. ; SEWELL, W. A. Subtypes of Epstein-Barr Virus(EBV) in Hodgkin's disease: Association between B-type EBV and immunocompromise *Blood*, New York, v. 81, n. 2, p. 468- 474, 1993.
25. BOYUM, A. Ficoll-Hypaque separation cells. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, Oslo, v. 21(Suppl.97), p. 51- 76, 1968.
26. BROUSSET, P. ; SHASHIKANT, C. ; SCHLAIFER, D. ET. AL. Detection of Epstein-barr virus messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease by in situ hybridization with Biotinylated probes on specially processed modified Acetone Methyl Benzoate Xilene(ModAMeX)sections. *Blood*, New York, v. 77, n. 8, p. 1781-1786, 1991.
27. BROWN, C. A. ; HALL, C. L. ; LONG, J. C. ; CAREY, K. ; WEITZMAN, S. A. ; AISEN BERG, A. C. Circulating immune complexes in Hodgkin's disease. *Am. J. Med.*, New York, v. 64, p. 289- 294, 1978.
28. BROWN, R. S. ; HAYNES, H. A. ; FOLEY, H. T. ; GODWIN, H. A. ; BERARD, C. W. ; CARBONE, P. P. Hodgkin's disease Immunologic, Clinical and Histologic features of 50 Untreated patients. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 67, p. 291- 300, 1967.
29. CABANILLAS, F. ; PATHAK, S. ; TRUJILLO, J. ; GRANT, G. ; CORK, A. ; HAGEMEISTER, F. B. ; VELASQUEZ, W. S. ; McLAUGHLIN, P. ; REDMAN, J. ; KATZ, R. ; BUTLER, J. J. ; FREIREICH, E. J. Cytogenetic features of Hodgkin's disease suggest possible origin from a lymphocyte *Blood*, New York, v. 71, n. 6, p. 1615- 1617, 1988.
30. CANELLOS, G. P. ; ANDERSON, J. R. ; KATHLEEN, J. P. ; NISSEN, N. ; COOPER, M. R. ; HENDENSON, E. S. ; GREEN, M. R. ; GOTTLIEB, A. ; PETERSON, B. A. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOOP, AVBD, or MOOP alternating with AVBD *N. Engl. J. M.*, Boston, Copenhagen, v. 19, p. 1478-1484, 1992.
31. CARBONE, P. P. ; KAPLAN, H. S. ; MUSSHOF, K. ; SMITHERS, D. W. ; TUBIANA, M. Report of the Committee on Hodgkin's disease staging classification. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 31, p. 1860- 1861, 1971.
32. CASAZZA, A. R. ; DUVALL, C. P. ; CARBONE, P. P. Summary of Infections Complications occurring in patientes with Hodgkin's disease *Cancer Res.*, Baltimore, v. 26, p. 1290- 1296, 1966.

33. CASE Jr., D. C. ; HANSEN, J. A. ; CORRRALES, E. ; YOUNG, C. W. ; DUPONT , B. ; PINSKY, C. M. ;GOOD, R. A. Comparison of multiple in vivo and in vitro parameters in untreated patients with Hodgkin's Disease **Cancer**, Philadelphia, v. 38, n. 4, p. 1807- 1815, 1976.
34. CASEY, T. T. ; OLSON, S. J. ; COUSAR, J. B. ; COLLINS, D. Immunophenotypes of Reed-Sternberg Cells: A study of 19 cases of Hodgkin's disease in plastic-embedded section **Blood**,New York, v. 74, n. 8, p. 2624-2628, 1989.
35. CASEY, T. T. ; FAIRFIELD, S. J. ; COUSAR, J. B. ; COLLINS, R. D. Immunophenotypes of Reed-Stenberg(RS) cells in plastic sections: A study of nine cases of nodular esclerosing(NS) Hodgkin's disease(HD) **Lab. Invest.**, v. 58, 16A, 1988.
36. CHAVES, E. Hodgkin's disease in the firs decade. **Cancer**, Philadelphia, v. 31, p. 925- 930, 1973.
37. CHEEVER, A. W. ; VALSAMIS, M. P. ; RABSON, A. S. Necrotizing Toxoplasmic encephalitis and Herpetic Pneumonia complicating treated Hodgkin's disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 7, p. 26- 29, 1965.
38. CHILOSE, M. ; SEMEZATO, G. ; CETTO, G. ; AMBROSETTI, A. ; FIORE-DONATI, L. ET AL. Soluble Interleukin-2 receptors in the sera of patients with Hairy cell leukimia: Relationship with the effectof Reconbinant alfa interferon therapy on clinical paramenters and Natural Killer in vitro activity. **Blood**, New York, v. 70, p. 1530- 1535, 1987.
39. COATES, P. J. ; SLAVIN, G. ; D ARDENNE. A. J. Persistence of Epstein-Barr Virus in Reed-Stenberg cells throughout the course of Hodgkin's disease' **J. Pathol.** , v. 164, p. 291- 297, 1991.
40. COLE, P. ; MacMAHON, B. ; AISENBERG, A. Mortality from Hodgkin's disease in the United States: Evidence for the multiple-etiology hypotesis. **Lancet**, London, v. 2, p. 1371- 1376, 1968.
41. CONNOLLY, C. S. Hodgkin's disease associated with Toxoplasma Gondii. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v. 112, p. 393- 396, 1963.
42. CONNORS, J. M. Is clinical chemotherapy better than standard four drug chemotherapy for Hodgkin's disease? Yes **Cancer Principles & Practice of Oncology** ,3rd Edition, v. 7, n. 2, p. 1- 6, 1993.
43. CORREA, P. ; O'CONOR, G.T. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. **Int. J. Cancer**, New York, v. 8, p. 192- 201, 1971.

44. COSTA, P. B. Doença de Hodgkin - Classificação Histológica de 127 pacientes segundo os critérios de Jackson e Parker e Rye. Curitiba, 1976. Tese (Livre docência em Clínica Médica) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 1976.
45. DAMLE, R. N. ; TATAKE, R. J. ; ADVANI, S. H. ; GANGAL, S. G. Affinity of IL-2 receptors and proliferation of mitogen activated lymphocytes in Hodgkin's disease. *Br. J. Cancer*, London, v. 61, p. 404- 406, 1990.
46. DAWAR, R. ; MANGALIK, A. Hodgkin's disease. *Am. J. Hematol.*, New York, v. 4, p. 209- 215, 1978.
47. DE GAST, G. C. ;HALIE, M. R. ;NIEWEG, H. O. Immunological responsiveness against two primary antigens in untreated patients with Hodgkin's disease *Eur. J. Cancer*, Oxford, v. 11, p. 217- 224, 1975.
48. DE VITA, V. T. ; HUBBARD, S. M. Hodgkin's disease *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 25, p. 560- 565, 1993.
49. DE VITA, V. T. Lymphocyte reactivity in Hodgkin's disease: A Lymphocyte civil war. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 15, p. 801- 802, 1973.
50. DE VITA, V. T. Jr. ; SERPICK, A. A. ; CARBONE, P. P. Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's disease *Ann. Inter. Med.* , Philadelphia, v. 73, n. 6, p. 881- 895, 1970.
51. DELSOL, G. ; BROUSSET, P. ; CHITTAL, S. ; RIGAL-HUGUET, F. Correlation of the expression of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Proteins and In Situ Hybridization with Biotinylated BamHI-W Probes in Hodgkin's Disease *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v. 140, n. 2, p. 247- 253, 1992.
52. DESFORGES, J. F. ; RUTHERFORD, C. J. ; F.R.C.P.A. ; PIRO, A. Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 29, p. 1212- 1222, 1979.
53. DIEHL, V. ; KALLE, C. V. ; FONATSCH, C. ; TESCH, H. ; JUECKER, M. ; SCHAADT, M. The cell of origin in Hodgkin's disease. *Semin. Oncol.*, New York, v. 17, p. 660- 672, 1990.
54. DINARELLO, C. A. ; WOLFF, S. M. The role of Interleukin-1 in disease *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 14, p. 106- 113, 1993.

55. DONALDSON, S. S. ; INK, M. P. ; McDOUGALL, R. ; PARKER, B. R. ; SHOCHAT, S. J. Clinical investigations of children with Hodgkin's disease at Stanford University Medical Center. W.A.Kamps in *Hodgkin's Disease in Children: Controversies and current practice*, Kluwer Academic Publishers, Boston, p. 307- 315, 1989.
56. DONALDSON, S. S. ; LINK, M. P. Hodgkin's disease-treatment of the young child. *Pediatr. Clin. North.Am.*, Philadelphia, v. 2, p. 457- 473, 1991.
57. DONALDSON, S. S. Hodgkin's disease in children. *Semin. Oncol.*, New York, v. 17, p. 736- 748. 1990.
58. DORREN, M. S. ; HABESHAW, J. A. ; WRIGLEY, P. F. M. ; LISTER, T. A. Distribution of T-Lymphocyte subsets in Hodgkin's disease characterized by monoclonal antibodies. *Br. J. Cancer*, London, v. 45, p. 491- 499, 1982.
59. DREXLER, H. G. ; JONES, D. B. ; DIEHL, V. ; MINOWADA, J. Is the Hodgkin's cell a T or B-Lymphocyte? Recent evidence from Geno- and Immunophenotypic analysis and in-vitro cell lines. *Hematol. Oncol.*, Chichester, v. 7, p. 95- 113, 1989.
60. EDINGTON, G. M. ; OSUNKOYA, B. O. ; HENDRICHSE, M. Histologic classification of Hodgkin's disease in the Western state of Nigeria. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, v. 50, p. 1633- 1637, 1973.
61. ENGLEMAN, E. G. ; BENIKE, C. ; HOPPE, R. T. ; KAPLAN, H. S. Suppressor cells of the mixed lymphocyte reaction in patients with Hodgkin's disease. *Transplant. Proc.*, New York, v. XI, p. 1827- 1829, 1979.
62. EZDINLI, E. Z. ; SIMONSON, K. L. ; SIMONSON, L. G. ET AL. T and B-RFC inhibiting factor in plasma from patients with active Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 44, p. 106- 111, 1979.
63. FORD, R. J. ; RAJARAMAN, C. ; LU, M. ; BLICK, M. In vitro analysis of cell populations involved in Hodgkin's disease lesions and in the characteristic T cell immunodeficiency. *Hematol. Oncol.*, Chichester, v. 6, p. 247- 255, 1988.
64. FORD, R. J. ; TSAO, J. ; KOUTTAB, N. M. ; SAHASRABUDDHE, C. G. ; MEHTA, S. R. Association of an Interleukin abnormality with the Tcell defect in Hodgkin's disease. *Blood*, New York, v. 64, p. 386- 392, 1984.

65. FRAUMENI, J. F. JR. ; LI, F.P. Hodgkin's disease in childhood: An epidemiologic study. *J. Nat. Cancer Inst.*, v. 42, p. 681- 691, 1969.
66. FREDERIKSEN, B. ; SPECHT, L. ; HENRICHSEN, J. ; PEDERSEN, F. K. ; PEDERSEN-BJERGAARD, J. Antibody response to pneumococcal vaccine in patients with early stage Hodgkin's disease. *Eur. J. Haematol.*, Copenhagen, v. 43, p. 45- 49, 1989.
67. FUJIMOTO, J. ; STEWART, S. J. ; LEVY, R. Immunochemical analysis of the release Leu-2(T8)molecule. *J. Exp. Med.*, New York, v. 160, p. 116- 124, 1984.
68. FUJIMOTO, J. ; LEVY, S. ; LEVY, R. Spontaneous release of the Leu-2(T8)molecule from human T cells. *J. Exp. Med.*, New York, v. 159, p. 752- 766, 1983.
69. FUJII, M. ; SUGAMURA, K. ; SANO, K. ; NAKAI, M. ; SUGITA, K. ; HINUMA, Y. High-affinity receptor-mediated internalization and degradation of Interleukin 2 in human T cells. *J. Exp. Med.*, New York, v. 163, p. 550- 562, 1986.
70. FUKS, Z. ; STROBER, S. ; KAPLAN, H. S. Interaction between serum factors and T lymphocytes in Hodgkin's disease. Use as a diagnostic test. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 295, p. 1273- 1278, 1976.
71. FUKS, Z. ; STROBER, S. ; BROBOVE, A. M. ; SASAZUZI, T. ; McMICHAEL, A. ; KAPLAN, H. S. Long term effects of Radiation on T and B Lymphocytes in Peripheral blood of patients with Hodgkin's Disease *J. Clin. Invest.*, New York, v. 58, n. 4, p. 803- 814, 1976.
72. GARDEN, A. S. ; WOO, S. Y. ET AL. Results of a changing treatment philosophy for children with stage I Hodgkin's disease: A 35-year experience. *Med. Pediatr. Oncol.*, New York, v. 19, p. 214- 220, 1991.
73. GEHAN, E. A. ; SULLIVAN, M. P. ; FULLER, L. M. ; JOHNSTON, J. ; KENNEDY, P. ET. AL. The intergroup Hodgkin's disease in children-A study of stage I and II. *Cancer*, Philadelphia, v. 65, p. 1429- 1437, 1990.
74. GILLIS, S. ; KOZAK, R. ; DURANTE, M. ; WEKSLER, M. E. Immunological studies of aging - Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans *J. Clin. Invest.*, New York, v. 67, p. 937- 942, 1981.
75. GLASER, S. L. Hodgkin's disease in black populations: A review of the epidemiologic literature. *Semin. Oncol.*, New York, v. 17, p. 643- 659, 1990.

76. GLEDHILL, S. ; GALLAGHER, A. ; JONE, D. B. ; KRAJEWSKI, A. S. ; ALEXANDER, F. E. ; KLEE, E. ; WRIGHT, D. H. ; O'BRIEN, C. O. ; ONIONS, D. E. ; JARRET, R. F. Viral involvement in Hodgkin's disease: Detection of clonal type A Epstein-Barr virus genomes in tumour samples. *Br. J. Cancer*, London, v. 64, p. 227, 1991.
77. GOODWIN, J. S. ; MESSNER, R. P. ; BANKHURST, A. D. ; PEAKE, G. T. ; SAIKI, J. H. ; WILLIAMS, R. C. Jr. Prostaglandin-producing suppressor cells in Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 297, p. 963- 968, 1977.
78. GRIFONI, V. Recent immunological findings in Hodgkin's disease *Tumori*, Milano, v. 59, p. 363- 373, 1973.
79. GRIMFORDS, G. ; SODERQVIST, M. ; HOLM, G. ; LEFVERT, A. K. ; BJORKHOLM, M. A longitudinal study of class and subclass antibody response to pneumococcal vaccination in splenectomized individuals with special reference to patients with Hodgkin's disease. *Eur. J. Haematol.*, Copenhagen, v. 45, p. 101- 108, 1990.
80. GRIMFORS, G. ; ANDERSSON, B. ; TULLGREN, O. ; GISCOMBE, R. ; HOLM, G. ; JOHANSSON, B. ; BJORKHOLM, M. Increased serum CD8 soluble antigen level is associated with blood lymphocyte abnormalities and other established indicators of a poor prognosis in adult Hodgkin's disease *Br. J. Haematol.*, Oxford, v. 80, p. 166- 171, 1992.
81. GRUFFERMAN, S. ; COLE, P. ; SMIT, P. G. B. Sc. ; LUKES, R. J. Hodgkin's disease in siblings. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 296, n. 3, p. 248- 250, 1977.
82. GRUFFERMAN, S. Clustering and aggregation of exposures in Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 39, p. 1829-1833, 1977.
83. GUPTA, S. Subpopulations of human T lymphocytes *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v. 42, p. 186- 195, 1980.
84. GUTENSOHN, N. ; COLE, P. Childhood social environment and Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 304, p.135- 140, 1981.
85. GUTENSOHN, N. ; COLE, P. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Semin. Oncol.*, New York, v. 7, p. 92- 102, 1980.
86. GUTENSOHN, N. ; COLE, P. Epidemiology of Hodgkin's disease in the young. *Int. J. Cancer*, New York, v. 19, p. 595- 604, 1977.

87. GUTENSOHN, N. M. The Epidemiology of Hodgkin's disease: Clues to Etiology. UT, MD. Anderson Clinical Conference on Cancer, v. 27, p. 3- 45, 1984.
88. GUTENSOHN, N. M. Social Class and age at Diagnosis of Hodgkin's disease: New Epidemiologic evidence for the "Two-disease hypothesis". *Cancer Treat. Rep.*, Bethesda, v. 66, p. 689- 695, 1982.
89. HAM, T. Role of suppressor cells in depression of T lymphocyte proliferative response in untreated and treated Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 45, p. 2102- 2108, 1980.
90. HEINEMAN, H. S. ; JENSEN, W. N. ; COOPER, W. M. ; BRAUDE, A. I. Hodgkin's disease and Salmonella typhimurium infection. *JAMA*, v. 18, p. 112- 114, 1964.
91. HENRY-AMAR, M. ; SOMERS, R. Survival outcome after Hodgkin's disease: A report from the international data base on Hodgkin's disease *Semin. Oncol.*, New York, v. 17, n.6, p. 758-768, 1990
92. HERBST, H. ; NIEDOBITEK, G. ; KNEBA, M. ; HUMMEL, M. ; FINN, T. ; ANAGNOSTOPOULOS, L. ; BERGHOLZ, M. ; KRIE High incidence of Epstein-Barr Virus genomes in Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.*, Philadelphia, v. 137, p. 13- 18, 1990.
93. HERSH, E. M. ; OPPENHEIM, J. J. Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 273, p. 1006- 1012, 1965.
94. HILLINGER, S. M. ; HERZIG, G. P. Impaired cell-mediated immunity in Hodgkin's disease mediated by suppressor lymphocytes and monocytes. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 61, p. 1620- 1627, 1978.
95. HODES, R. J. T cell mediated regulation: Help and Supression *Fundamental Immunology*, Second edition, New York ,chapter 20 , p. 587- 620, 1989.
96. HOLM, G. ; MELLSTEDT, H. ; BJORKHOLM, M. ; JOHANSSON, B. ; KILLANDER, D. ET. AL. Lymphocyte abnormalities in untreated patients with Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 37, p. 751- 762, 1976.
97. HOPPE, R. T. Radiation therapy in the management of Hodgkin's disease. *Semin. Oncol.*, New York, v. 17, p. 704- 715, 1990.
98. HORS, J. ; DAUSSET, J. HLA and susceptibility to Hodgkin's disease. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v. 70, p. 167- 192, 1983.

99. HSU, C. C. S. ; MORGAN, E. R. Indirect immunofluorescent assays for Acute Lymphoblastic Leukemia(ALL) cell-associated antigen. Elimination of non-specific fluorescent stain on lymphoid cells. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 73, p. 633- 638, 1980.
100. HUTTER, R. V. P. , COLLINS, H. S. The occurrence of opportunistic fungus infections in a cancer hospital Laboratory investigation, v. 11, n. 11, p. 1035- 1045, 1962.
101. JARRETT, R. F. ; GALLAGHER, A. ; JONES, B. D. ; ALEXANDER, F. E. ; KRAJEWSKI, A. S. ; KELSEY, A. ; ADAMS, J. ; ANGUS, B. ; GLEDHILL, S. ; WRIGHT, D. H. ; CARTWRIGHT, R. A. ; ONIONS, D. E. Detection of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease: Relation to age *J. Clin. Pathol.*, v. 44, p. 844- 848, 1991.
102. JUCKER, M. ; SCHAADT, M. ; DIEHL, V. ; POPPEMA, S. ; JONES, D. ; TESCH, H. Heterogeneous expression of proto-oncogenes in Hodgkin's disease derived cell lines. *Hematol. Oncol.*, New York, v. 6, p. 191- 204, 1990.
103. KAPLAN, H. S. ; SMITHERS, D. W. Auto-Immunity in man and Homologous disease in mice in relation to the malignant lymphomas. *Lancet*, London, v. 4, p. 1- 4, 1959.
104. KAPLAN, H. S. Hodgkin's disease:Unfolding concepts concerning its nature,management and prognosis. *Cancer*, Philadelphia, v. 45, p. 2439- 2474, 1980.
105. KATZ, D. H. The Immune System: An Overview Stites, D. P. et al in *Basic & Clinical Immunology*, California, 4th edition, p.13- 20, 1982.
106. KAUFFMAN, C. A. ; ISRAEL, K. S. ; SMITH, J. W. ; WHITE, A. C. ; SCHWARZ, J. ; BROOKS, G. F. Histoplasmosis in Immunosuppressed patients. *Am. J. Med.*, New York, v. 64, p. 923- 932, 1978.
107. KELLER, A. R. ; KAPLAN, H. S. ; LUKES, R. J. ; RAPPAPORT, H. Correlation of histopathology with other prognostic indicators in Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 487- 499, 1968.
108. KOMP, D. M. ; SHAPIRO, E. ; McNAMARA, J. Soluble Interleukin-2 receptor in childhood Non-Hodgkin's Lymphoma *Blood*, New York, v. 71, p. 1172- 1173, 1988.
109. LANG, J. M. ; TONGIO, M. M. ; OBERLING, F. ; MAYER, S. Mixed-lymphocyte reaction as assay for immunological competence of lymphocytes from patients with Hodgkin's disease. *Lancet*, London, v. 10, p. 1261- 1263, 1972.

110. LANGE, B. ; LITTMAN, P. Management of Hodgkin's disease in children and adolescents. *Cancer*, Philadelphia, v. 51, p. 1371- 1377, 1983.
111. LANGENHUYSEN, M. M. A. C. ; CAZEMIER, T. ; HOUWEN, B. ; BROUWERS, TH. M. ; HALIE, M. R. ; THE, T. H. ; NIEWEG, H. Antibodies to Epstein-barr virus, cytomegalovirus, and Australia antigen in Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 34, p. 262- 267, 1974.
112. LAURIA, F. ; FOA, R. ; GOBBI, M. ; CAMASCHELLA, C. ; LUSSO, P. ET. AL. Increased proportion of Suppressor/Citotoxic(OKT8+)cells in patients with Hodgkin's disease in long-lastin remission. *Cancer*, Philadelphia, v. 52, p. 1385- 1388, 1983.
113. LEVY, L. M. ; MBCHB. Hodgkin's disease in black Zimbabweans. *Cancer*, Philadelphia, v. 61, p. 189- 194, 1988.
114. LEVY, R. ; KAPLAN, H. S. Impaired lymphocyte function in untreated Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 290, p. 181- 186, 1974.
115. LISTER, T. A. ; CROWTHER, D. ; SUTCLIFFE, S. B. ; GLATSTEIN, E. ; CANELLOS, G. P. ; YOUNG, R. C. ; ROSENBERG, S. A. ; CALTMAN, C. A. ; TUBIANA, M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting *J. Clin. Oncol.*, New York, v. 7, n. 11, p. 1630- 1636, 1989.
116. LISTER, T. A. ; CROWTHER, D. Staging for Hodgkin's disease. *Semin. Oncol.*, New York, v. 17, p. 696- 703, 1990.
117. LONGO, D. L. The use of chemotherapy in the treatment of Hodgkin's disease. *Semin. Oncol.*, New York, v. 17, p. 716- 735, 1990.
118. LUKES, R. J. ; BUTLER, J. J. The Pathology and Nomenclature of Hodgkin's disease *Cancer Res.*, Baltimore, v. 26, p. 1063- 1081, 1966.
119. LUKES, R. J. ; CRAVER, L. F. ; HALL, T. C. ; RAPPAPORT, H. ; RUBEN, P. Report of the nomenclature committee. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 26, p. 1311, 1966.
120. MacMAHON, B. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 26, p. 1189- 1200, 1966.

121. MAIZEL, A. L. ; MEHTA, S. R. ; FORD, R. J. ; LACHMAN, L. B. Effect of Interleukin 1 on human thimocytes and purified human T cells. *J. Exp. Med.*, New York, v. 153, p. 470- 475, 1981.
122. MARCON, L. ; RUBIN, L. A. ; KURMAN, C. C. ; FRITZ, M. E. ; LONGO, D. L. ET AL. Elevated serum levels of soluble TAC peptide in adult T-cell Leukimia:Correlation with clinical status during chemotherapy. *Ann. Inter. Med.*, Philadelphia, v. 109, p. 274- 279. 1988.
123. MAUCH, P. ; GORSHEIN, D. ; CUNNINGHAM, J. ; HELLMAN, S. Influence of mediastinal adenopathy on site and frequency of relapse in patients with Hodgkin's disease *Cancer Treat. Rep.*, v. 66, n. 4, p. 809-817, 1982.
124. MAUCH, P. M. ; WEINTEIN, H. ; BOTNICK, L. ; BRILLI, J. ; CASSADY, J. R. An evaluation of long-term survival and treatment complications in children with Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 51, p. 925- 932, 1983.
125. McCLAIN, K. L. ; HEISE, R. ; DAY, D. L. ; LEE, C. K. K. ; WOODS, W. G. ; AEPPLI, D. Hodgkin's disease in children: Correlation of clinical characteristic, staging procedures, and treatment at the University of Minnesota. *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, New York, v. 12, p. 147- 154, 1990.
126. MENDIUS, J. R. ; DE HORATIUS, R. J. ; MESSNER, R. P. ; WILLIAMS, R. C. Family distribution of Lymphocytotoxins in Hodgkin's disease. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 84, p. 151- 156, 1976.
127. MERK, K. ; BJORKHOLM, M. ; TULLGREN, O. ; MELLSTEDT, H. ; HOLM, G. Immune deficiency in Family members of patients with Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 66, p. 1938- 1943, 1990.
128. MEUER, S. C. ; HUSSEY, R. E. ; PENTA, A. C. ; FITZGERALD, K. A. ; STADLER, B. M. ; CCHLOSSMAN, S. F. ET. AL Cellular origin of Interleukin 2(IL-2) in man: Evidence for stimulus-restricted IL-2 production by T4+ and T8+ T lymphocytes. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 129, n. 3, p. 1076-1079, 1982.
129. MIETTINEN, M. ; FRANSILA, K. O. ; SAXEN, E. Hodgkin's disease, lymphocytic predominance nodular: Increased risk for subsequent non-Hodgkin's lymphoma *Cancer*, Philadelphia, v. 51, p. 2293- 2300, 1983.
130. MINASSIAN, A. A. Supressor cells in the peripheral blood and splen of patients with Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 57, p. 1756- 1761, 1986.

131. MORRIS, C. S. ; STUART, A. E. Reed-Sternberg/Lymphocyte rosette: Lymphocyte subpopulations as defined by monoclonal antibodies. *J. Clin. Pathol.*, London, v. 37, p. 767- 771, 1984.
132. MUELLER, N. ; EVANS, A. ; HARRIS, N. L. ; COMSTOCK, G. W. ; JELLUM, E. ; MAGNUS, K. ET. AL. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 320, n. 11, p. 689- 695, 1989.
133. MURRAY, P. G. ; YOUNG, L. S. ; ROWE, M. ; CROCKER, J. Immunohistochemical demonstration of the Epstein- Barr Virus-Encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease *J. Pathol.*, v. 166, p. 1- 5, 1992.
134. NORRIS, D. G. ; BURGERT, O. Jr. ; COOPER, H. A. ; HARRISON, E. G. Jr. Hodgkin's disease in childhood. *Cancer*, Philadelphia, v. 36, p. 2109- 2120, 1975.
135. OBERLIN, O. ; LEVERGER, G. ; PACQUEMENT, H. ; RAQUIN, M. A. ; CHOMPRET, A. ; HABRAND, J. L. ; TERRIER-LACOMBE, M. J. ; BEY, P. ; BERTRAND, Y. ; HUBIE, H. ; BEHAR, C. ; ZUCKER, J. M. ; SCHAISON, G. ; LEMERLE, J. Low-dose radiation therapy and reduced chemotherapy in childhood Hodgkin's disease: The experience of French Society of Pediatric Oncology *J. Clin. Oncol.*, New York, v. 10, p. 1602- 1608 1992.
136. OLSSON, L. ; D'AMORE, F. ; DIAMANT, M. ; BEHNHE, O. Phenotypic attributes of the malignant cell population in Hodgkin's disease. *UT. MD. Anderson Clinical - Conference on Cancer*, v. 27, p. 11- 26, 1984.
137. ORDER, S. E. ; HELLMAN, S. Pathogenesis of Hodgkin's disease. *Lancet*, London, v. 11, p. 571- 573, 1972.
138. PALLESEN, G. ; HAMILTON-DUTOIT, S. J. ; ROWE, M. ; YOUNG, L. S. Expression of Epstein- Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet*, London, v. 337, n. 9, p. 320- 322, 1991.
139. PARKER, B. R. ; CASTELLINO, R. A. ; KAPLAN, H. S. Pediatric Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 37, p. 2430- 2435, 1976.
140. PAUL, W. E. *The Immune System: An Introduction Fundamental Immunology*, Second Edition, chapter 1, New York, 1989
141. PIZZOLO, G. ; CHILOSE, M. ; SEMEZATO, G. The soluble Interleukin-2 receptor in haematological disorders. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v. 67, p. 377- 380. 1987.

142. PIZZOLO, G. ; CHILOSE, M. ; VINANTE, F. ; DAZZI, F. ; LESTANI, M. ET. AL. Soluble Interleukin-2 receptors in the serum of patients with Hodgkin's disease. **Br. J. Cancer**, London, v. 55, p. 427- 428, 1987.
143. POPPEMA, S. ; KALETA, J. ; HEPERLE, B. Chromosomal abnormalities in pacientes with Hodgkin's disease: Evidence for frequent involvement of the 14q chromosomal region but infrequent bcl-2 gene rearrangement in Reed-Sterberg cels **J. Nat. Cancer Inst.**, v. 84, n. 23, p. 1789- 1792, 1992.
144. POSNER, M. R. ; REINHERZ, E. ; LANE, H. ; MAUCH, P. ; HELLMAN, S. ; SCHLOSSMAN, S. F. Circulation lymphocyte populations in Hodgkin's disease after mantle and paraaortic irradiation. **Blood**, New York, v. 61, p. 705- 708, 1983.
145. POSNER, M. R. ; REINHERZ, E. L. ; BREARD, J. ; NADJER, L. M. ; ROSENTHAL, D. S. ; SCHLOSSMAN, S. F. Lymphoid subpopulations of peripheral blood and spleen in untreated Hodgkin's disease. **Cancer**, Philadelphia, v. 48, p. 1170- 1176, 1981.
146. PRAZAK, J. ; HERMANSKA, Z. Study of HLA antigens in patients with Hodgkin's disease. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v. 43, p. 50- 53, 1989.
147. PROSNITZ, L. R. ; ROBERTS, K. B. Combined Chemotherapy and Radiotherapy for Hodgkin's disease **Oncology**, Basel, v. 6, n. 3, p. 113- 132, 1992.
148. PUI, C-H. ; IP, C. H. ; THOPSON, E. ; WILIMAS, J. ; BROWN, M. ; DODGE, R. K. ; HOYOS, R. A. ET. COL. High surum Interleukin-2 receptor levels correlate with a poor prognosis in children with Hodgkin's disease. **Leukemia**, v. 3, n. 6, p. 1- 7, 1989.
149. PUI, C-H. ; IP, S. H. ; DODGE, R. K. ; CARRABIS, S. ; BROWN, M. ET AL. Serum levels of CD8 Antigen in childhood Lymphoid Malignancies: Apossible indicator of increased suppressor cell activityin poor-risk patients. **Blood**, New York, v. 72, p. 1015- 1021, 1988.
150. PUI, C-H. ; IP, S. H. ; THOMPSON, E. ; DODGE, R. K. ; BROWN, M. ET. AL. Increased serum CD8 antigen level in childhood Hodgkin's disease relates to advanced stage and poor treatment outcome. **Blood**, New York, v. 73, p. 209- 213, 1989.
151. PUI, C-H. ; IP, S. H. ; IFLAH, S. ; BEHM, F. G. ; GROSE, B. H. ET. AL. Serum Interleukin 2 receptor levelsin childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Blood**, New York, v. 71, p. 1135- 1137, 1988.
152. PUI, C-H. Serum Interleukin-2 receptor: Clinical and Biological implications. **Leukemia**, v. 3, p. 323- 327, 1989.

153. PUI, C.H. ; IP, S. H. ; KUNG, P. ; DODGE, R. K. ; BERARD, C. W. ET AL. High serum Interleukin-2 receptor levels are related to advance disease and a poor outcome in childhood Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood*, New York, v. 70, p. 624- 628, 1987.
154. RAPPAPORT, H. ; BERARD, C. W. ; BUTLER, J. J. ; DORFMAN, R. F. ; LUKES, R. J. ; THOMAS, L. B. Report of the Committe on Histopathological criterio contributing to staging of Hodgkin's disease. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 31, p. 1864- 1865, 1971.
155. RICKINSON, A. B. ; EPSTEIN, M. A. ; CRAWFORT, D. H. Clonal growth of Hodgkin's cell. *Nature*, London, v. 258, p. 235- 238, 1975.
156. ROBISON, B. ; KIGSTON, J. ; COSTA, R. N. ; MALPAS, J. S. ; BARRETT, A. ; MCELWAIN, T. J. Chemotherapy and irradiation in childhood Hodgkin's disease. *Arch. Dis. Child.*, London, v. 59, p. 1162- 1167, 1984.
157. ROMAGNANI, S. ; MAGGI, E. ; BLAGIOTTI, R. ; GIUDIZI, M. G. ; AMADORI, A. ; RICCI, M. Altered propotions of Th and Ts cell subpopulations in patients with Hodgkin's disease. *Scand. J. Immunol.*, Oxford, v. 7, p. 511- 514, 1978.
158. ROMAGNANI, S. ; DEL PRETE, G. F. ; MAGGI, E. ; BOSI, A. ; BERNARDI, F. ET. AL. Displacement of Tlymphocytes with the Help/Inducer phenotipe from peripheral blood to lymphoid organs in untreated patients with Hodgkin's disease. *Scand. J. Haematol.*, Copenhagen, v. 31, p. 305- 314, 1983.
159. ROMAGNANI, S. ; FERRINE, P. L. R. ; RICCI, M. The immune derangement in Hodgkin's disease. *Semin. Hematol.*, New York, v. 22, n. 1, p. 41- 55, 1985.
160. ROSENBERG, S. A. ; BOIRON, M. ; DE VITA, V. T. ; JOHNSON, R. E. ; LEE, B. J. ; ULTMANN, J. E. ; VIAMONTE, M. JR. Report of the committee on Hodgkin's disease staging procedures. *Cancer Res.*, Baltimore, v. 31, p. 1862- 1863, 1971.
161. ROTHENBERG, E. V. The development of functionally responsive T cells *Advances in Immunology*, v. 54, p. 85- 214, 1992.
162. ROUX, M. ; SCHRAVEN, B. ; ROUX, A. ; GAMM, H. ; MERTELSMANN, R. ; MEUER, S. Natural inhibitors of T-cell activation in Hodgkin's disease. *Blood*, New York, v. 78, n. 9, p. 2365- 2371, 1991.
163. RUBIN, L. A. ; KURMAN, C. C. ; FRITZ, M. E. ; BIDDISON, N. E. ; BOUTIN, B. ET AL. Soluble Interlekin 2 receptors are release from actived human lymphoid celles in vitro. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 135, p. 3172- 3177, 1985.

164. SCHNITZER, B. ; NISHIYAMA, R. H. ; HEIDELBERGER, K. P. ; WEAVER, D. K. Hodgkin's disease in children. *Cancer*, Philadelphia, v. 31, p. 560- 567, 1973.
165. SCHOMBERG, P. J. ; EVANS, R. G. ; OCONNELL, M. J. ; WHITE, W. L. ; BANKS, P. M. ; ILSTRUP, D. M. ; EARLE, J. D. Prognostic significance of mediastinal mass in adult Hodgkin's disease *Cancer*, London, v. 53, p. 324-328, 1984.
166. SCHULOF, R. S.; LACHER, M. J.; GUPTA, S. Abnormal Phitohemagglutinin-induce T-cell proliferative responses in Hodgkin's disease. *Blood*, New York, v. 57, p. 607- 613, 1981.
167. SCHULOF, R. S. ; BOCKMAN, R. S. ; GAROFALO, J. A. ; CIRRINCIONE, C. ; CUNNINGHAM-RUNDLES, S. ; ET. AL. Multivariate analysis of T-cell functional defects and circulating serum factors in Hodgkin's disease. *Cancer*, Philadelphia, v. 48, p. 964- 973, 1981.
168. SEMENZATO, G. ; FOA, R. ; AGOSTINE, C. ; ZAMBELLO, R. ; TRENTIN, L. ET. AL. High serum levels of soluble Interleukin 2 receptor in patients with B Chonic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, New York, v. 70, p. 396- 400, 1987.
169. SERRAINO, D. ; FRANCESCHI, S. ; TALAMINI, R. ET AL. Socio-economic indicators, infectious diseases and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer*, New York, v. 47, p. 352- 357, 1991.
170. SHANBROM, E. ; MILLER, S. ; HARR, H. Herpes Zoster in hematologic neoplasias: Some unusual manifestations *J. Clin. Path.*, v. 53, n. 3, p. 523- 533, 1960.
171. SHIBATA, D. ; HANSMANN, M. L. ; WEISS, L. M. ; NATHWANI, B. N. Epstein-Barr virus infections and Hodgkin's disease: A study of fixed tissues using the polimerase chain reaction. *Hum. Pathol.*, v. 22, p. 1262, 1991.
172. SILVERMAN, D. T. ScM. ; CORREA, P. ; O'CONOR, G. T. ; MYERS, M. H. ; AXTELL, L. M. ; BRAGG, K. U. A comparacion of Hodgkin's disease in Alameda County, California, and Connecticut. *Cancer*, Philadelphia, v. 39, p. 1758- 1763, 1977.
173. SIXBEY, J. W. ; SHIRLEY, P. ; CHESNEY, P. J. ; BUTIN, D. M. ; RESNICK, L. Detection of a second widepread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet*, London, v. 2, p. 761, 1989.
174. SLIVNICH, D. J. ; NAWROCKI, J. F. ; FISHER, R. I. Immunology and cellular biology of Hodgkin's disease. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, Philadelphia, v. 3, n. 2, p. 205- 220, 1989.

175. SLIVNICK, D. J. ; ELLIS, T. M. ; NAWROCKI, J. F. ; FISHER, R. I. The impact of hodgkin's disease on the immune system. **Semin. Oncol.**, New York, v. 17, p. 673- 682, 1990.
176. SMITHERS, D. W. Hodgkin's disease: One entity or two? **Lancet**, London, v. 2, p. 1285- 1288, 1970.
177. SOLIDORO, A. ; GUZMAN, C. ; CHANG, A. Relative increased incidence of childhood Hodgkin's disease in Peru. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 26, p. 1204- 1208, 1966.
178. SPECHT, L. ; LAURITZEN, A. F. ; NØR DENTOF, A. M. ; ANDERSEN, A. F. ; CHRISTENSEN, B. E. ET AL. Tumor cell concentration and tumor burden in relation to histopathologic subtype and other prognostic factors in early stage Hodgkin's disease. **Cancer**, Philadelphia, v. 65, p. 2594- 2601, 1990.
179. SPECHT, L. ; PEDERSEN-BJERGAARD, J. Hodgkin's disease: Recent concepts in classification and treatment. **Eur. J. Haematol.**, v. 42, p. 7- 14, 1989.
180. STEINER, P. E. Etiology of Hodgkin's Disease - Skin reaction to avian and human tuberculin proteins in Hodgkin's Disease **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v. 54, p. 11- 17, 1934.
181. STEIS, R. G. ; BRODER, S. Acquired Immune Deficiency Syndrome(AIDS) and Kaposi's Sarcoma: Clinical Relationship between Immunodeficiency Disease and Cancer Devita, V.T. at al in **Important Advances in Oncology**, Philadelphia, p. 141- 157, 1985.
182. STEIS, R. G. ; MARCON, L. ; CLARK, J. ; URBA, W. ; LONGO, D. L. ET AL. Serum soluble IL-2 receptor as Tumor marker in patients with Hairy cell Leukemia. **Blood**, New York, v. 71, p. 1304- 1309, 1988.
183. STRUM, S. B. ; RAPPAPORT, H. Hodgkin's disease in the first decade of life. **Pediatrics**, Evanston, Il., v. 46, p. 748- 759, 1970.
184. SULLIVAN, M. P. Hodgkin's disease in children. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 1, p. 603- 620, 1987.
185. TESCH, H. ; JUCKER, M. ; MARTIN, H. F. ; BORNKAMM, G. W. ; JONES, D. B. ; DIEHL, V. Molecular analysis of Hodgkin's disease-derived cell lines. **Hematol. Oncol.**, New York, v. 6, p. 223- 231, 1988.
186. THANGAVELU, M. ; LEBEAU, M. M. Chromosomal Abnormalities in Hodgkin's disease. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 3, p. 221- 236, 1989.

187. THAR, T. L. ; MILLION, R. R. ; HAUSNER, R. J. ; McKETTY, M. H. B. Hodgkin's disease, stage I and II. Relationship of recurrence to size of disease, radiation dose, and number of sites involved *Cancer*, London, v. 43, p. 1101- 1105, 1979.
188. TILLY, H. ; BASTARD, C. ; DELASTRE, T. ; DUVAL, C. ; BIZET, M. ; LENORMAND, B. ; DAUCE, J-P. ; MONCONDUIT. Cytogenetic studies in untreated Hodgkin's disease. *Blood*, New York, v. 6, p. 1298- 1304, 1991.
189. TWOMEY, J. J. ; RICE, L. Impact of Hodgkin's disease upon the immune system. *Semin. Oncol.*, New York, v. 7, p. 114- 125, 1980.
190. TWOMEY, J. J. ; LAUGHTER, A. H. ; FARROW, S. ; DOUGLASS, C. C. Hodgkin's disease-an immunodepleting and immunosuppressive disorder. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 56, p. 467- 475, 1975.
191. TWOMEY, J. J. ; LAUGHTER, A. H. ; RICE, L. ; FORD, R. Spectrum of immunodeficiencies with Hodgkin's disease. *J. Clin. Invest.*, New York, v. 66, p. 629- 637, 1980.
192. VALAGUSSA, P. ; SANTORO, A. ; FOSSATI-BELLAN, F. ; FRANCHI, F. ; BANFI, A. ; BONADONNA, G. Absence of treatment-induced second neoplasms after ABVD in Hodgkin's disease. *Blood*, New York, v. 59, p. 488- 494, 1982.
193. VANHAELEN, C. P. J. ; FISHER, R. I. Increased sensitivity of T cells to regulation by normal suppressor cells persists in long-term survivors with Hodgkin's disease. *Am. J. Med.*, New York, v. 72, p. 385- 390, 1982.
194. VIANNA, N. J. ; GREENWALD, P. ; DAVIES, J. N. P. Nature of Hodgkin's disease agent. *Lancet*, London, v. 10, p. 733- 735, 1971.
195. VIANNA, N. J. ; POLAN, A. K. ; DAVIES, J. N. P. ; WOLFGANG, P. Familial Hodgkin's disease: An environmental and genetic disorder *Lancet*, London, v. 12, p. 854- 857, 1974.
196. VIANNA, N. J. ; POLAN, A. K. Immunity in Hodgkin's disease:Importance of age at exposure. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 89, p. 550- 556, 1978.
197. WAGNER, D. K. ; KIWANUKA, J. ; EDWARDS, B. K. ; RUBIN, L. A. ; NELSON, D. L. ; MAGRATH, I. T. Soluble Interleukin-2 receptor levels in patients with undifferentiated and Lymphoblastic Lymphomas : Correlation with survival. *J. Clin. Oncol.*, New York, v. 5, p. 1262-1274, 1987.

198. WALDMANN, T. A. ; GOLDMAN, C. K. ; ROBB, R. J. ; DEPPE, J. M. ; LEONARD W. J. ET AL. Expression of Interleukin-2 receptors on activated human B cells. *J. Exp. Med.*, New York, v. 160, p. 1450- 1466, 1984.
199. WEDELIN, C. ; BJORKHOLM, M. ; HOLM, G. ; OGENSTAD, S. ; JOHANSSON, B. ; MELLSTEDT, H. Lymphocyte function in untreated Hodgkin's disease: an important predictor of prognosis. *Br. J. Cancer*, London, v. 45, p. 70- 79, 1982.
200. WEISS, L. M. ; MOVAHED, L. A. ; WARNKE, R. A. ; SKLAR, J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 320, p. 502- 506, 1989.
201. YOUNG, R. C. ; CORDER, M. P. ; HAYNES, H. A. ; DE VITA, V. T. Delayed Hypersensitivity in Hodgkin's disease- A study of 103 untreated patients. *Am. J. Med.*, New York, v. 52, p. 63- 72, 1972.
202. YOUNG, R. C. ; CORDER, M. P. ; BERARD, C. W. ; DE VITA, V. T. ; BETHESDA. Immune alterations in Hodgkin's disease. *Arch. Intern. Med.*, Chicago, v. 131, p. 446- 454, 1973.
203. ZIEGLER, J. L. ; FASS, L. ; BLUMING, A. Z. ; MAGRATH, I. T. ; TEMPLETON, A. C. Chemotherapy of childhood Hodgkin's disease in Uganda *Lancet*, London, v. 30, p. 679- 682, 1972.
204. ZUR HAUSEN, H. ; SCHULTE-HOLTHAUSEN, H. ; KLEIN, G. ; HENLE, W. ; HENLE, G. ; CLIFFORD, P. ; SANTESON, L. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, London, v. 228, p. 1056- 1058, 1970.