
ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI 67 NOS DIFERENTES SUBTIPOS DO LINFOMA DE HODGKIN: ESTUDO DESCRITIVO.

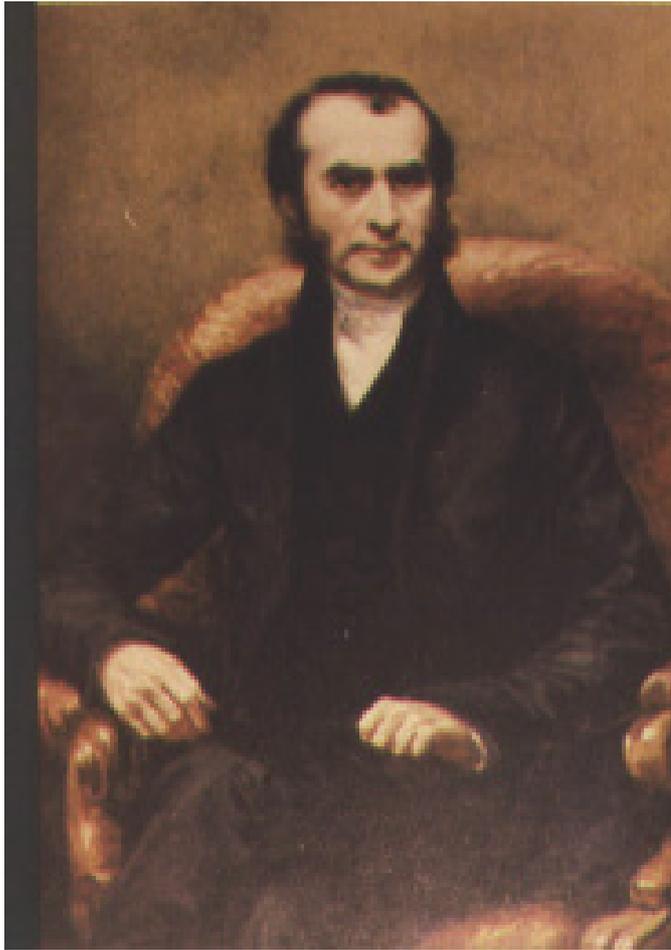
Dissertação de Mestrado em Anatomia Patológica

UFPE



2002

TERESA CRISTINA BARROS SANTIAGO



Thomas Hodgkin, 1798-1866

“A descoberta consiste em ver o que todo mundo já viu

e pensar o que ninguém pensou”

Alber Szent-György (Prêmio Nobel em Medicina 1937)

Santiago, Teresa Cristina Barros, 1968

Índice de proliferação celular Ki 67 nos diferentes subtipos do Linfoma de Hodgkin:Estudo descritivo.[Recife], 2002.

V, 58 p., 29,7 cm (UFPE, M.Sc., Anatomia Patológica, 2002).

Dissertação – Universidade Federal de Pernambuco. CCS.

1.Doença de Hodgkin. 2. Linfoma 3.Imunohistoquímica. 4. Ki 67 5. MIB 1 I. Título.

ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR KI 67 NOS DIFERENTES SUBTIPOS DO LINFOMA DE HODGKIN: ESTUDO DESCRITIVO.

Teresa Cristina Barros Santiago

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia patológica da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Anatomia Patológica.

Aprovada em ___/___/2002 por:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello, UFPE

Prof. Dra. Maria do Carmo de Carvalho Aberu e Lima, UFPE

Prof. Dra. Paloma , UFPE

Prof. Dra. Cynthia , HEMOPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Recife, 2002

Universidade Federal de Pernambuco

Reitor

Prof. Mozart Neves Ramos

Vice-Reitor

Prof. Geraldo José Marques Pereira

Pró-Reitor para assuntos de pesquisa e pós-graduação

Prof. Paulo Roberto Freire Cunha

Centro de Ciência da Saúde

Diretor

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

Hospital das Clínicas

Diretor Superintendente

Prof. Efren de Aguiar Maranhão

Departamento de Patologia

Chefe

Prof. Luciano Tavares Montenegro

Programa de Pós-graduação em Patologia

Mestrado em Anatomia Patológica

Coordenador

Prof. Roberto José Vieira de Melo

Vice-Coordenador

Prof. Dra. Maria do Carmo de Carvalho Aberu e Lima

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Normando e Sonia** ,

que sempre estão presentes em todos

os caminhos da minha vida.

Ao meu orientador **Dr. Roberto José Vieira de Mello**,

exemplo de profissional e mestre.

À **Raul C. Ribeiro** pelo apoio e incentivo essenciais

para que este trabalho tenha sido concluído.

Resumo.....	5
Abstract.....	7
Introdução	9
Objetivos.....	21
Material e Métodos.....	22
Resultados.....	34
Discussão.....	39
Conclusão.....	47
Agradecimentos.....	48
Referências.....	49



TERESA CRISTINA BARROS SANTIAGO	Dissertação de Mestrado	2002
---------------------------------	-------------------------	------

RESUMO

Este trabalho objetiva avaliar se a atividade proliferativa celular determinada pelo anticorpo MIB 1 mostra diferença significativa entre os vários subtipos do Linfoma de Hodgkin e se poderia, desta forma, ser utilizado no auxílio da caracterização e subclassificação desta entidade nosológica.

O material para este estudo foi obtido a partir da seleção de 53 casos do arquivo do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco que tiveram o diagnóstico histológico de Linfoma de Hodgkin. Os casos abrangem pacientes de ambos os sexos, sem restrições de faixa etária, resultantes de biópsias de linfonodos. Foi realizada a revisão histológica e a reação imunohistoquímica utilizando-se o anticorpo anti-Ki67, o qual é expresso por células proliferantes durante todas as fases do ciclo celular, exceto a fase G-0 (repouso) e é considerado o padrão ouro em proliferação celular.

O resultado deste estudo mostrou que nenhum padrão característico de expressão do MIB 1(anti-Ki 67) foi observado em qualquer um dos

subtipos histológicos do Linfoma de Hodgkin, fazendo com que a realização do marcador MIB 1 (anti-Ki 67), para estes casos, não auxiliasse na subclassificação dos mesmos.

A realização de marcadores imunohistoquímicos como o CD 15, CD 30, CD 20, EMA e ALK é recomendada em casos de suspeita de Linfoma de Hodgkin, visto que os mesmos, em conjunto com os achados histológicos, permitem melhor acurácia diagnóstica, subclassificação e exclusão dos diagnósticos diferenciais.

Palavras-chaves: Linfoma de Hodgkin / Doença de Hodgkin / Subtipos Histológicos / Imunohistoquímica / Ki67 / MIB 1/Índice de Proliferação Celular

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate if the index of cellular proliferation expressed by Ki67 using MIB 1 antibody shows any difference between the Hodgkin's Lymphoma subtypes and if so, it can be used to help this diagnosis and categorization in each different subgroups of this disease.

The material for this study was collected from the file of Departamento de Patologia do Hospital do Cancer de Pernambuco. There were selected 53 cases of lymph node biopsy that had a previous diagnosis of Hodgkin's Lymphoma. Age and gender are not considered in this study.

We did a review of H&E slides and immunohistochemistry reaction using a MIB 1 antibody (anti-Ki 67) that is express by proliferant cells that are in all phases of the cellular cycle, except the G-0 phase. The MIB 1 is considered a "gold-standard" of cell proliferation marker.

None characteristic pattern of Ki67 expression using MIB 1 antibody was noted in any subgroup of Hodgkin's Lymphoma in this study and it doesn't seem to help to subclassify this entity.

It is recommended to do immunohistochemistry reaction using CD 15, CD 30, CD 20, EMA and ALK in all case of suspicious for Hodgkin's Lymphoma. They can in combination with the histological findings make a final diagnosis and exclude the differential diagnosis with others entities.

Key words: Hodgkin's Lymphoma / Hodgkin's Diseases / Histological subtypes / Immunohistochemistry / Ki67 / MIB 1/Prolieration cell index

INTRODUÇÃO

O Linfoma de Hodgkin é uma neoplasia maligna que acomete primariamente linfonodos, baço e fígado, com incidência de aproximadamente 8.000 novos casos por ano na América do Norte (Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, 1999) (McCunney RJ, 1999) e representa cerca de 0,7% de todos os casos novos de câncer nos EUA (Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, 1999) (McCunney RJ, 1999).

Foi descrita por Thomas Hodgkin em 1832 com a nomenclatura inicial de Doença das Glândulas absorventes, sendo posteriormente denominada como Doença de Hodgkin e mais recentemente Linfoma de Hodgkin. Em 1898 e 1902, Carl Stenberg e Dorothy Reed, descreveram independentemente a célula típica diagnóstica—célula de Reed-Sternberg (Pileri SA, Ascani S, Leoncini L *et al.*, 2002).

A maior incidência em brancos que em negros e em homens que em mulheres, é mais evidente em países desenvolvidos que em países em desenvolvimento.

Nos Estados Unidos e em outros países industrializados, o primeiro pico de incidência ocorre no final da segunda década e o segundo pico por volta dos 50 anos. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o primeiro pico é mais precoce, ocorrendo antes da adolescência (Grufferman SL, Delzell E, 1984). Estudos epidemiológicos demonstram que nestas localidades há 3 formas distintas de apresentação do Linfoma de Hodgkin: uma forma da infância (até 14 anos), uma forma ocorrendo no adulto jovem (de 15 a 34 anos) e uma terceira forma mais tardia ocorrendo entre 55 a 74 anos (Grufferman SL, Delzell E, 1984).

Recentes estudos usando microdissecção e métodos de genética molecular que caracterizam genes receptores de antígenos a partir de uma única célula neoplásica, em conjunto com o estudo dos mecanismos de apoptose, expressão antigênica e produção de citocinas pelas células malignas tem permitido um maior entendimento da patofisiologia desta entidade nosológica.

A ocorrência ocasional de grupos geográficos com maior incidência do Linfoma de Hodgkin foi um dos primeiros indícios de que poderia haver uma possível etiologia viral com incubação por um período de latência.

O Vírus de Epstein Barr (EBV) tem sido já demonstrado fazer parte da patogênese de alguns casos de Linfoma de Hodgkin, especialmente a forma clássica, e com incidência maior em alguns subtipos histológicos como a Celularidade mista (aproximadamente 75% dos casos) (Brousset P, Knecht H, Rubin B *et al.*, 1993) (Mourad W, Alsohaibani MO, Saddik M, Bazerbashi S, 1998).

Em alguns casos foi determinada a coexistência do Linfoma de Hodgkin e da Mononucleose infecciosa. Forte marcação citoplasmática e de membrana foi observada em células de Reed-Sternberg de 40 casos em um total de 48 casos de Linfoma de Hodgkin analisados, utilizando-se anticorpo para o EBV (Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, *et al.*, 1991).

Tem sido notado uma maior incidência do Linfoma de Hodgkin no grupo dos pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em relação a população geral. Em um estudo onde foram avaliados apenas casos de Linfoma de Hodgkin em pacientes HIV positivo (Vírus da Imunodeficiência Humana), a expressão do EBV, usando

método de imunohistoquímica, foi identificada em um percentual de 78% (Tirelli U, Errante D, Dolcetti R *et al.*, 1995).

As células neoplásicas características do Linfoma de Hodgkin, as células de Reed-Sternberg (CRS) e células de Hodgkin (CH) compreendem uma minoria da população celular (0,1-1,0%) que envolve os linfonodos ou tecidos acometidos pela doença, existindo uma mistura heterogênea de linfócitos maduros, histiócitos, eosinófilos, plasmócitos, fibroblastos e outras células reativas em quantidades variadas, a depender do subtipo histológico, e que em conjunto constituem um “background”, que apesar de não ser um componente maligno, é parte importante na caracterização do quadro histológico desta doença.

A célula de Reed-Sternberg (CRS) apresenta 2 ou mais núcleos, cada um contendo um nucléolo (Brousset P, Knecht H, Rubin B *et al.*, 1993). Estas células grandes, multinucleadas são o ponto central do diagnóstico do Linfoma de Hodgkin (Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ *et al.*, 1992) (Colby TV, Hoppe RT, Warnke RA, 1981).

A primeira classificação proposta para o Linfoma de Hodgkin foi a Classificação de Jackson e Parker em 1944 (Jackson H Jr, Parker F Jr, 1944), que introduzia os subgrupos de Paragranuloma, Granuloma e Sarcoma (Tabela 1).

O Paragranuloma era caracterizado pela proliferação de linfócitos normais associado a proliferação de células de Reed-Sternberg isoladas ou em pequenos grupos.

Os casos definidos como Granuloma eram aqueles que exibiam uma proliferação de células de Reed-Sternberg em meio a um “background” composto por linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e histiócitos. Fibrose era freqüentemente vista neste subgrupo.

Os casos definidos por Jackson e Parker como Linfoma de Hodgkin tipo Sarcoma eram aqueles caracterizados pelo predomínio de células atípicas com um mínimo de células linfocitárias, eosinófilos e plasmócitos.

Em 1966 Lukes e Butler introduziram uma nova Classificação, a qual subdividiu o grupo Paragranuloma em Linfocitário e/ou Histiocítico (L&H) nodular e Linfocitário e/ou Histiocítico (L&H) difuso; o subgrupo

de Granuloma foi dividido nas formas Esclerose Nodular e Categoria Mista e finalmente o tipo Sarcoma em Fibrose Difusa e Fibrose Reticular (Lukes RJ, Craver LF, Hall TC *et al.*, 1966).

Com o propósito de simplificar esta nova Classificação, foi realizado uma conferência em Rye, Nova Iorque, EUA, a qual combinou os tipos L&H Nodular e Difuso em uma nova categoria, única, denominada Predominância Linfocitária. Manteve o subgrupo Esclerose Nodular, renomeou a Categoria mista como Celularidade Mista e agrupou os tipos Fibrose difusa e Fibrose reticular em uma única categoria denominada Depleção Linfocitária (Tabela 1) (Rye Classification)(Cver L F, Hall TC, Rappaport H, Rubin P, 1966).

Em 1994 o Grupo Internacional de Estudo dos Linfomas propôs uma revisão da classificação vigente para o Linfoma de Hodgkin, fazendo parte da Classificação REAL para os Linfomas (Revised European-American Lymphoma Classification - REAL)(Harris NL, Jaffe ES, Stein H *et al.*, 1994) (Mason DY, Banks PM, Chan J *et al.*, 1994).

A Classificação da REAL reconhece a forma Nodular Predominância Linfocitária (L&H) do Linfoma de Hodgkin como uma entidade histológica distinta, sob o ponto de vista imunofenotípico e com características prognósticas diferentes do grupo do Linfoma de Hodgkin forma clássica, o qual engloba as formas Esclerose Nodular, Celularidade Mista e Depleção Linfocitária.

Atualmente as características imunofenotípicas estão mais bem estabelecidas e esclarecidas, com papel importante no diagnóstico e subclassificação das doenças linfoproliferativas incluindo o Linfoma de Hodgkin. Uma nova classificação para doenças hematológicas proposta pela Organização Mundial de saúde no ano de 2001 (OMS- 2001) sugere mais um novo subgrupo para o Linfoma de Hodgkin — Linfoma de Hodgkin Clássico, Predominância Linfocitária (LHCPL) (Tabela 1).

A célula de Reed-Sternberg presente nas formas Esclerose Nodular, Celularidade Mista e Depleção Linfocitária são positivas para o CD15 (Leu-M1) em aproximadamente 75-85% dos casos (Hsu SM, Jaffe ES, 1984) e para CD30 (Ki-1) praticamente todos os casos(Quadro 1)(Figuras 1 e 2) (Stein H, Mason DY, Gerdes J *et al.*, 1985).

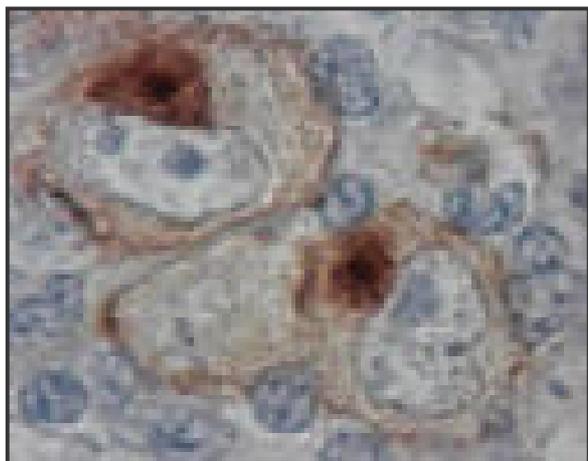


Figura 1 – Células de Hodgkin mostrando positividade ao CD 30 com padrão de Golgi (630X).

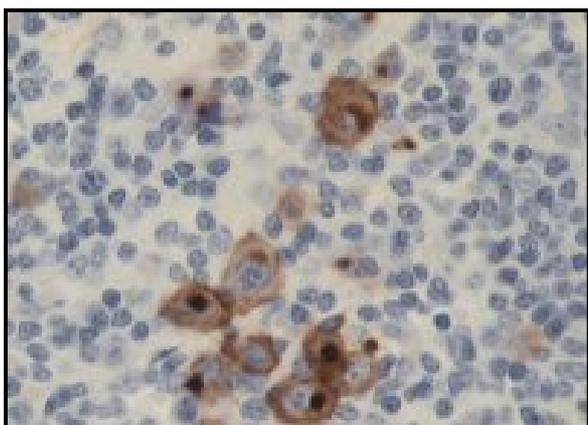


Figura 2 – Células de Hodgkin mostrando positividade ao CD 15 com padrão citoplasmático (500X).

A célula L&H presente na forma do Linfoma de Hodgkin Nodular, Predominância Linfocitária é positiva para CD 20, CD 79a, BCL 6 e CD 45 em praticamente todos os casos (Coles FB, Cartun RW, Pastuszek WT, 1988).

Tabela 1 - Classificações para a Linfoma de Hodgkin no decorrer do tempo

<i>Jackson e Parker, 1944</i>	<i>Lukes e Butler, 1966</i>	<i>Rye, 1966</i>	<i>REAL, 1994</i>	<i>OMS, 2001</i>
Paragranuloma	L&H nodular	L&H Predominância Linfocitária	L&H Predominância Linfocitária	L&H Predominância Linfocitária
	L&H difuso			
				Linfoma de Hodgkin Clássica, Predominância Linfocitária
Granuloma	Esclerose Nodular	Esclerose Nodular	Esclerose Nodular	Esclerose Nodular
	Categoria Mista	Celularidade Mista	Celularidade Mista	Celularidade Mista
Sarcoma	Fibrose difusa	Depleção Linfocitária	Depleção Linfocitária	Depleção Linfocitária
	Fibrose Reticular			

Quadro 1- Padrão de reatividade Imunohistoquímica dos Linfomas

Tipos de Doenças Hematológicas Malignas	CD45	CD3	CD 45RO	CD20	CD15	CD30	CD68	CD99
Linfoma de células B	+	-	-	+	-	+/-	-	-
Linfoma de células T	+	+	+	-	-	+	-	-
Linfoma de Hodgkin Clássica	+/-	-	-	-	+	+	-	-
Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocitária	+/-	-	-	+ (L&H)	-	-	-	-

Este novo subgrupo proposto pela Classificação da OMS (Linfoma de Hodgkin Clássico, Predominância Linfocitária), exibe um Padrão histológico semelhante a forma Predominância Linfocitária, entretanto as células malignas (células de Reed-Sternberg) são CD 15 e CD 30 positivas, como nos outros três subtipos da forma clássica.

Acredita-se que o LHCPL na verdade seria uma forma “precoce” da Celularidade Mista, sem, até o momento, comprovação de diferença prognóstica dos outros tipos clássicos de Linfoma de Hodgkin.

Trabalhos de micromanipulação de célula de Reed-Sternberg isolada, retirada de cortes de linfonodos, com conseqüente amplificação da imunoglobulina, rearranjo e análise do genótipo destas células, permitiram concluir que a célula de Reed-Sternberg do Linfoma de Hodgkin forma clássica represente uma célula do clone celular B derivada das células do centro germinativo (98% dos casos) (Marafioti T, Hummel M, Foss HD *et al.*, 2000), as quais teriam perdido a habilidade de expressão de seus anticorpos B, decorrente de mutações somática e rearranjo da imunoglobulina (Kuppers R, Rajewsky K, 1998) (Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML *et al.*, 1996), ao passo que as células L&H da forma Predominância Linfocitária manteriam ainda esta capacidade. Em raros casos, as CRS e as CH derivam das células T periféricas pós-tímicas (Muschen M, Rajewsky K, Brauninger A *et al.*, 2000) (Seitz V, Hummel M, Marafioti T *et al.*, 2000) (Kuppers R, Brauninger A, Muschen M *et al.*, 2001).

OBJETIVOS

- 1) Avaliar se a atividade proliferativa celular determinada pelo anticorpo MIB 1 mostra diferença significativa entre os vários subtipos do Linfoma de Hodgkin.
- 2) Avaliar se o anticorpo MIB 1 anti-Ki 67 poderia ser utilizado para caracterização e subclassificação do Linfoma de Hodgkin.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 53 casos do arquivo do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer de Pernambuco que tiveram o diagnóstico histológico de Linfoma de Hodgkin.

Os casos abrangem pacientes de ambos os sexos sem restrições de faixa etária, resultantes de biópsias de linfonodos.

Casos de consulta de segunda opinião realizados no Hospital do Câncer de Pernambuco, não foram incluídos neste trabalho por não estarem disponíveis os blocos de parafina que possibilitassem recorte e exame imunohistoquímico dos mesmos.

Os casos que não preencheram todos os critérios histológicos classicamente definidos para o diagnóstico do Linfoma de Hodgkin (listados no Quadro 2) também foram excluídos da amostra.

Foram realizados novos cortes histológicos nos blocos de parafina dos casos selecionados, utilizando-se micrótomo rotatório para cortes

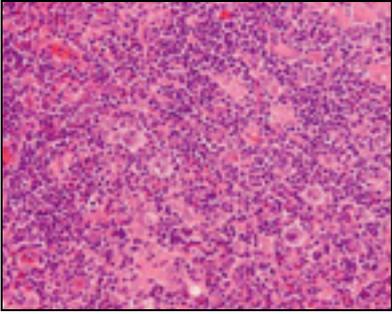
histológicos com espessura de 3-4 micra, e após desparafinização, foram submetidos a coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E).

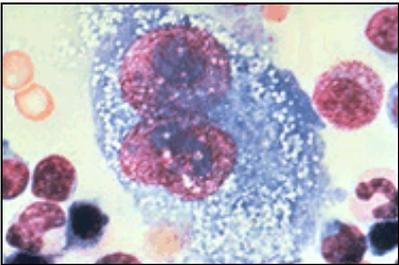
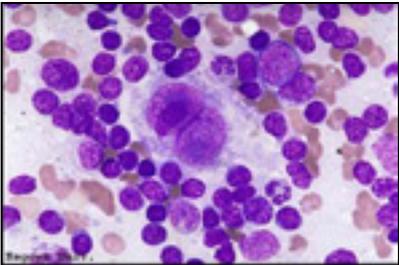
Os novos cortes histológicos foram avaliados em microscópio óptico de múltipla observação utilizando-se de objetivas 5X, 10X, 20X, 40X e 63X, com avaliação simultânea de 2 observadores.

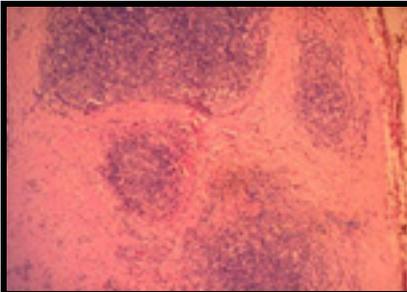
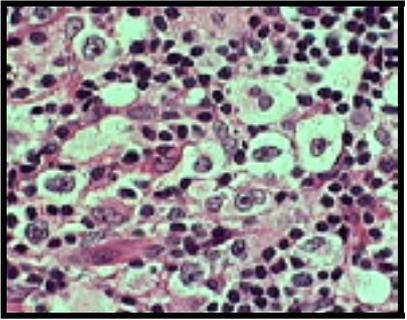
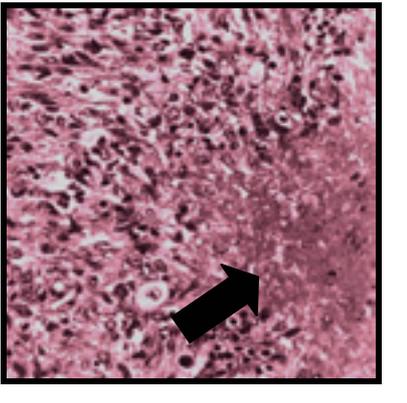
Os critérios histológicos clássicos determinados pela literatura mundial para o diagnóstico e subclassificação do Linfoma de Hodgkin, descritos neste trabalho no Quadro 2, foram rigorosamente seguidos, sendo a concordância diagnóstica entre os 2 observadores, requisito fundamental para inclusão dos respectivos casos neste trabalho e locação dos mesmos nos diferentes subgrupos.

Desta forma, foram selecionados um total de 53 casos, assim distribuídos nos diferentes subtipos histológicos do Linfoma de Hodgkin: 06 casos de Linfoma de Hodgkin Predominância Linfocitária (PL), 15 casos de Linfoma de Hodgkin Celularidade Mista (CM), 25 casos de Doença de Hodgkin Esclerose Nodular (EN) e 07 casos de Linfoma de Hodgkin Depleção Linfocitária (Tabela 2).

Quadro 2 - Critérios Histológicos para o diagnóstico e subclassificação do Linfoma de Hodgkin

SUBTIPOS	ASPECTOS HISTOLÓGICOS
<p data-bbox="284 577 579 663">L&H, PREDOMINÂNCIA LINFOCITÁRIA</p>  <p data-bbox="284 1128 638 1272">Figura 3 – Corte histológico de Linfonodo Cervical acometido por Linfoma de Hodgkin (H&E) 200X</p>	<p data-bbox="707 577 1452 663">Identificação da célula L&H (célula grande, com grande núcleo, normalmente multilobulado e escasso citoplasma –“popcorn cell”).</p> <p data-bbox="707 741 1452 826">“Background” composto por proliferação nodular de linfócitos pequenos e histiócitos, ocasionalmente de aspecto epitelióide.</p> <p data-bbox="707 904 1452 990">A arquitetura linfonodal apresenta-se parcialmente obliterada com aspecto hiperplásico no tecido linfóide adjacente não acometido.</p> <p data-bbox="707 1021 1452 1164">Ocasionalmente, pode-se observar transformação Progressiva do Centro Germinativo em tecido não envolvido pelo Linfoma de Hodgkin (Figura 3).</p>

<p>CELULARIDADE MISTA</p>  <p><u>Figuras 4</u> – Célula de Reed-Sternberg em Material de Imprint de linfonodo (Coloração de Grunwald Giemsa) 1000X</p>  <p><u>Figuras 5</u> – Célula de Reed-Sternberg em Material de Imprint de Linfonodo (Coloração de Grunwald Giemsa) 500X</p>	<p>A arquitetura linfonodal quase sempre esta alterada, porém casos de envolvimento linfonodal parcial é observado.</p> <p>Células de Hodgkin e de Reed-Sternberg são facilmente encontradas (ambas as formas, mono e multinucleadas). As células de Reed-Sternberg são células grandes medindo entre 20 e 50 μ , geralmente apresentam citoplasma acidofílico, com área levemente basofílica e região “pálida” correspondente ao complexo de Golgi. O núcleo é grande, normalmente Bi ou multilobulado, com membrana nuclear espessa. A cromatina é vesicular porém ausente em região perinucleolar, ocasionando um halo claro ao redor do nucléolo (Figuras 4 e 5). Normalmente existe um nucléolo para cada lóbulo do núcleo, proeminente, redondo e eosinofílico.</p> <p>A celularidade é amplamente variável de caso para caso e a presença de necrose é rara.</p> <p>O “background” é composto por uma mistura de tipos celulares, com grande número de histiócitos e eosinófilos.</p>
--	---

<p>ESCLEROSE NODULAR</p> 	<p>Formação de abundante colágeno maduro organizado em bandas que envolve e divide o tecido linfóide em nódulos é marca predominante (Figura 6).</p> <p>O grau de fibrose é variável desde área focal do tecido linfóide, até total esclerose do linfonodo, em casos avançados.</p>
<p><u>Figura 6</u> – Padrão de Fibrose no subtipo Esclerose nodular (H&E) 200X</p>	<p>Nota-se espaçamento da capsula do linfonodo e ocasional necrose.</p>
	<p>Os nódulos delineados pelas bandas de fibrose apresentam número variável de CH e CHS, linfócitos pequenos e outras células reativas. Eosinófilos são freqüentes em alguns casos.</p>
<p><u>Figura 7</u> – Células Lacunares (H&E) 1000X</p>	<p>A célula lacunar, variante da célula de Hodgkin, é o tipo celular predominantemente observado neste subgrupo. A célula lacunar caracteriza-se pela presença de núcleo multilobulado, porém com menos lóbulos e nucléolo menos proeminente. O citoplasma é abundante e anfófilo. Em tecidos fixados em formalina, estas células mostram uma retração artefactual do citoplasma, fazendo com que a membrana citoplasmática quase encoste na membrana nuclear, dando uma aparência de que o núcleo ocupa uma lacuna vazia—daí a denominação atribuída a este tipo celular—célula lacunar (Figura 7). Em materiais fixados em B5 este aspecto artefactual não está presente.</p>
	
<p><u>Figura 8</u> –área de necrose (H&E) 400X (seta)</p>	

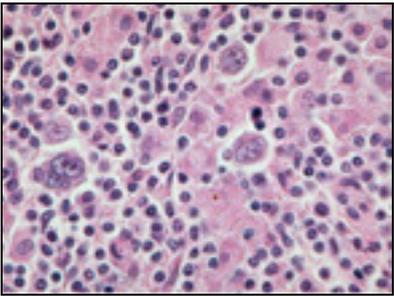
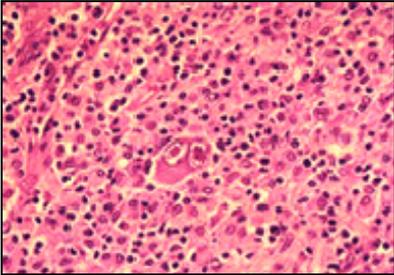
<p>DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA</p>  <p><u>Figura 9</u> – Grande número de células de Reed-Sternberg (H&E) 500X</p>  <p><u>Figura 10</u> – Célula de Reed-Sternberg em meio a background polimórfico (H&E) 500X</p>	<p>Dividi-se em 2 subtipos : fibrose difusa e subtipo reticular.</p> <p>No subtipo fibrose difusa observa-se uma distorção da arquitetura linfonodal devido a presença de uma proliferação de fibrose que tende a envolver elementos celulares isoladamente. Bandas de fibrose estão ausentes. A celularidade é relativamente baixa e as células de Reed-Sternberg são mais raramente encontradas.</p> <p>No subtipo Reticular observa-se a presença de um grande número de células de Reed-Sternberg pleomórficas (Figura 9). Colágeno entre estas células pleomórficas poderá ser observado, demonstrando um “overlap” com o subtipo de fibrose difusa.</p>
--	---

Tabela 2 - Distribuição dos casos analisados nos diferentes subtipos da Doença de Hodgkin

Subtipos	N	%
Esclerose Nodular (ES)	25	48
Celularidade Mista (CM)	15	28
Depleção Linfocitária (DL)	7	13
Predominância Linfocitária (PL)	6	11
Total	53	100

Após seleção e subclassificação dos casos em estudo foi realizado a reação de imunohistoquímica utilizando o anticorpo MIB 1 (anti-Ki 67) marca Dako. Foram utilizados cortes histológicos de linfonodos de padrão reacional como material de controle.

A reação foi realizada manualmente, utilizando-se de anticorpo policlonal MIB 1 (anti-Ki 67) marca Dako (Clone K₁S₅) e usando o método Padrão ABC e 3,3' diaminobenzidina (Dako) como cromogen.

Os cortes histológicos com espessura de 3-4 micra, secaram em estufa por 12 horas, em temperatura de 80°C e depois foram convencionalmente desparafinizados até o estágio de água destilada. Foi realizado a recuperação antigênica dos tecidos usando o pré-tratamento com Tampão Citrato 10mM/pH 6,0 (21g de Ácido Cítrico monohidratado PA diluído em 1000ml de água destilada) em forno de microondas por 10 minutos em potência máxima e 20 minutos dentro da solução, dentro do forno de microondas, porém desligado. Seguiu-se com lavagem em água corrente. A inativação da peroxidase endógena foi realizada com solução de Metanol (150ml) adicionado 1,5 ml de Peróxido de Hidrogênio a 3% com incubação por 20 minutos. Seguiu-se com lavagem em água corrente.

A incubação do anticorpo primário MIB 1 (Clone K₁S₅) foi realizado “overnight” (por 12 horas) usando-se diluição de 1/75. O anticorpo foi diluído com tampão PBS (NaCl 160,0g + Na₂HO₄ 27,31g + NaH₂PO₄2H₂O 4,8g + 1000ml de água Destilada). A incubação foi feita em geladeira (temperatura de 3-5°C) mantendo as lâminas já com o anticorpo em recipiente fechado com tampa (box de material plástico) com esponja na base. Decorrido as 12 horas de incubação, prosseguiu-se com lavagem em PBS (NaCl 160,0g + Na₂HO₄ 27,31g + NaH₂PO₄2H₂O 4,8g + 1000ml de água destilada) com 3 trocas de 5 minutos cada.

A incubação com o anticorpo secundário (“Link”), Imunoglobulina LSAB marca Dako, foi realizada em 40 minutos. Seguiu-se com 3 lavagens em PBS (NaCl 160,0g + Na₂HO₄ 27,31g + NaH₂PO₄2H₂O 4,8g + 1000ml em água destilada) com 3 trocas de 5 minutos cada.

Em seguida incubou-se com a Peroxidase conjugada (Streptoavidina) do kit LSAB Marca Dako por igualmente 40 minutos. Seguiu-se com 3 lavagens em PBS (NaCl 160,0g + Na₂HO₄ 27,31g + NaH₂PO₄2H₂O 4,8g + 1000 ml de água destilada) com 3 trocas de 5 minutos cada.

Para revelação da reação utilizou-se o cromogen DAB (3-3'diaminobenzidina) marca Dako com diluição de 2ml da solução de diluição do sistema DAB Dako para 1 gota de 3-3'diaminobenzidina. O tempo de incubação com o DAB foi variável, sendo controlado por observação microscópica.

Seguiu-se com lavagem em água corrente e depois com água destilada por 3 minutos.

A contra-coloração desta reação foi feita com Hematoxilina de Harris (CO 23471) marca Qeel, por 30 segundos. Seguiu-se com lavagem em água corrente e depois com água destilada, prosseguindo-se com desidratação e montagem das lâminas com lamínulas e Entelan (Tabela 3).

As células Ki 67 positivas mostraram uma coloração marrom no núcleo. A lâmina controle correspondente a tecido de linfonodo reacional foi positiva mostrando marcação nuclear em células linfóides.

As lâminas resultantes da reação de imunohistoquímica para o anticorpo MIB 1 (anti-Ki 67) de todos os casos já selecionados e previamente classificados nos diferentes subtipos do Linfoma de Hodgkin foram

avaliadas sob observação microscópica por um observador * usando a grade de Weibel de 400 pontos onde a área corresponde a $0,087616 \text{ mm}^2$ para um aumento de 400X.

Cada caso foi avaliado contando-se 10 campos (correspondentes a 10X uma área da grade) usando a objetiva de 40X, totalizando $0,87616 \text{ mm}^2$.

Mesmo obtendo-se positividade do caso controle da reação, foi considerado essencial a presença de linfócitos positivos para o MIB 1 em todos os casos avaliados.

* Patologista Teresa Santiago

Tabela 3 – Reação manual de Imunohistoquímica do anticorpo MIB 1 (anti-Ki 67)

<i>PROCEDIMENTO DA REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA</i>	<i>TEMPO</i>
Corte histológico com espessura de 3-4 μ	Não aplicável
Seleção das lâminas de tecido controle (Linfonodo de Padrão Reacional)	Não aplicável
Secagem das lâminas em estufa (80 ° C)	12 horas (“overnight”)
Desparafinização e hidratação das lâminas em Xileno e Álcool, respectivamente	13 minutos
Pré- tratamento com solução de Tampão Citrato 10mM/pH 6,0 em forno microondas	30 minutos
Bloqueio da peroxidase endógena usando Metanol e Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) a 3%	20 minutos
Incubação do Anticorpo Primário Ki 67 (MIB 1) marca Dako Clone K1S5	12 horas (“over night”)
Incubação do anticorpo secundário (“link”) kit LSAB da Dako	40 minutos
Incubação da estreptoavidina kit LSAB da Dako	40 minutos
Revelação da reação com Cromogen DAB (3,3’ – diaminobenzidina)	Variável, com controle sob observação microscópica.
Contra-coloração com Hematoxilina de Harris	30 segundos
Desidratação e montagem das lâminas	Não aplicável

RESULTADOS

O número de células de Hodgkin e células de Reed-Sternberg positivas na reação imunohistoquímica para o Ki 67 (usando o anticorpo MIB 1) nos 53 casos avaliados ficou distribuído como mostra a Tabela 4.

O padrão de resposta a reação do Ki 67 (MIB 1) mais freqüentemente observado dentre os 53 casos avaliados foi de 1 célula de Hodgkin e/ou célula de Reed-Sternberg positiva em 10 campos, correspondendo a 12/53 (22%). Os padrões de resposta menos freqüente foram de 15 células positivas em 10 campos, 18 células positivas em 10 campos, 20 células positivas em 10 campos, 21 células positivas em 10 campos e 25 células positivas em 10 campos, todos mostram apenas um caso alocado em cada um destes subgrupos 1/53 (2%).

Tabela 4 – Positividade ao MIB 1 (anti-Ki 67) dos 53 casos de Linfoma de Hodgkin avaliados

Nº de Células positivas em 10 campos 400X	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	15	18	20	21	25	
EN	5	6	2	4	-	1	1	-	-	2	2	1	-	-	1	-	25
CM	-	4	2	-	2	2	-	1	1	1	-	-	-	1	-	1	15
PL	2	2	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	6
DL	-	-	-	1	1	-	1	-	1	1	1	-	1	-	-	-	7
Total de Casos	7	12	5	5	3	3	2	2	2	4	3	1	1	1	1	1	53

EN = Esclerose Nodular; CM = Celularidade Mista; DL = Depleção Linfocitária; PL = Predominância Linfocitária

Tabela 5 – Padrão de Positividade ao MIB 1 (anti-Ki 67) dos 53 casos de Linfoma de Hodgkin divididos de acordo com o número de células positivas em baixo, intermediário e alto grau

Nº de Células positivas em 10 campos 400X	< 4	%	>5 < 9	%	> 12 < 25	%		%
	Baixo		Intermediário		Alto		Total	
EN	17	32,08	4	7,55	4	7,55	25	47,18
CM	6	11,32	7	13,21	2	3,77	15	28,30
PL	5	9,43	1	1,87	0	0	6	11,32
DL	2	3,77	3	5,67	2	3,77	7	13,20
Total de Casos	30	56,60	15	28,30	8	15,10	53	100

EN = Esclerose Nodular; CM = Celularidade Mista; DL = Depleção Linfocitária; PL = Predominância Linfocitária

Sete casos dos 53 em estudo (13%) não mostraram nenhuma célula de Hodgkin e/ou de Reed-Sternberg positiva nos 10 campos avaliados na reação imunohistoquímica para o Ki 67. Estes mesmos casos revelaram pelo menos um linfócito positivo ao MIB 1 (anti-Ki 67), mostrando que apesar da negatividade das células malignas, a reação foi essencialmente satisfatória. Os casos que mostraram nenhuma célula de Hodgkin e/ou de Reed-Sternberg positiva eram dos subgrupos Predominância Linfocitária (2/53) e Esclerose Nodular (5/53). Nenhum caso classificado como Celularidade Mista e Depleção Linfocitária exibiram este padrão de expressão com nenhuma célula de Hodgkin e/ou de Reed-Sternberg positiva.

O maior número de células de Hodgkin e/ou Reed-Sternberg positivas ao Ki67 foi de 25 células em 10 campos com aumento de 400X. Foi observado em 1/53 (2%) o qual foi previamente subclassificado no subtipo Celularidade Mista (CM).

Como descrito na Tabela 5, quando agrupamos os casos em 3 grupos de acordo com o seu grau de positividade ao Ki 67 em baixo grau (< ou = a 4 células positivas em 10 campos de grande aumento), grau intermediário (>

ou = a 5 ou < ou = a 9 células positivas em 10 campos de grande aumento) e Alto grau (> ou = a 12 ou < ou = a 25 células em 10 campos de grande aumento), 56,6% dos casos pertencem ao grupo de baixo grau (30/53) sendo a maioria deles pertencentes ao subgrupo histológico de Esclerose Nodular 17/53 (32,08%).

DISCUSSÃO

O exame histológico ainda é o principal passo para o diagnóstico, entretanto o advento da biologia molecular com análise a nível “sub-celular” permite o patologista obter informações sobre o comportamento celular. Um avanço importante nesta área foi o desenvolvimento da técnica de quantificação de proliferação celular através da imunohistoquímica em tecidos fixados em formalina. Uma idéia sobre o grau de proliferação celular pode ser obtido através do índice mitótico, entretanto este método é subjetivo e sujeito as alterações artefactuais.

A identificação de uma proteína e antígenos associados com os componentes do ciclo celular facilitou muito a investigação sobre proliferação tumoral. O índice de proliferação celular é um importante fator demonstrador de agressividade tumoral, sendo hoje importante fator prognóstico.

O MIB 1 é um anticorpo anti-Ki-67 (proteína nuclear do ciclo celular) que pode ser empregado em tecidos fixados em formalina e em tecidos rotineiramente processados com recuperação antigênica através de microondas. Descrito pela primeira vez por Gerdes e colaboradores

(Gerdes J, Lemke H, Baisch H, *et al.*, 1984) é expresso por células proliferantes durante todas as fases do ciclo celular, exceto a fase G- 0 (repouso); o MIB 1 é considerado o padrão ouro em proliferação celular (Mochen C, Giardini R, Costa A, Silvestrini R, 1997) (Abele MC *et al.*, 1997).

Nas últimas décadas, o valor prognóstico deste índice proliferativo em diferentes tipos histológicos de neoplasias malignas, como câncer de mama, mieloma múltiplo, sarcoma de partes moles, câncer da próstata, Linfomas e adenocarcinomas tem sido largamente utilizado (Figura 8).

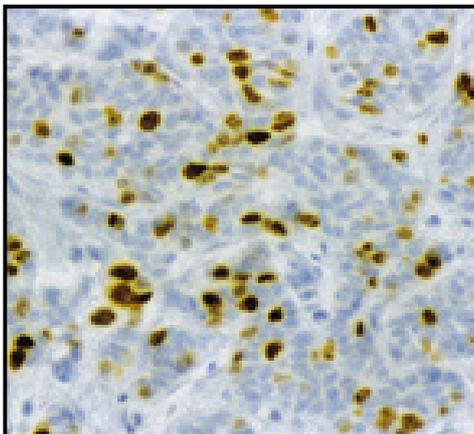


Figura8– Reação de Imunohistomíquica mostrando positividade nuclear do anticorpo MIB 1 em corte Histológico de parafina (400X).

A utilização do Ki-67 no painel imunohistoquímico de várias neoplasias tem aumentado, uma vez que estes marcadores de expressão de

proliferação celular auxiliam na seleção de tumores mais agressivos com índice proliferativo elevado, permitindo, desta forma, a aplicação de uma terapia mais apropriada ao comportamento biológico da célula maligna.

Há correlação de taxas de recidiva mais elevadas, menor sobrevida e menor período livre de doença nos carcinomas mamários que apresentam índices proliferativos elevados do anticorpo MIB 1 detectado por reação de imunohistoquímica (Narita M, Nakao K, Ogino N *et al.*, 1998) (Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C *et al.*, 1997).

No passado os diferentes subtipos do Linfoma de Hodgkin estavam relacionados com diferentes prognósticos, desde que tratados adequadamente, e conduzidos clinicamente com diferentes protocolos e opções terapêuticas. Estas diferenças prognósticas têm desaparecido com a introdução de modernas técnicas de radioterapia e novos agentes quimioterápicos, fazendo com que a maioria dos casos sejam curáveis.

Atualmente estágio de apresentação da doença e a presença de sintomas sistêmicos (Lukes RJ,1971) (Butler JJ, Hicks EB,1966) (Kant JA, Hubbard SM, Longo DL *et al.* , 1986) são muito mais importantes do que o subtipo

histológico como fator preditivo de prognóstico (LuKes RJ, Butler JJ, Hicks EB,1966) (Josting A, Wolf J, Diehl V , 2000).

Os critérios histológicos para o diagnóstico do Linfoma de Hodgkin são classicamente definidos—presença das células de Reed-Sternberg em um “background” polimórfico de linfócitos, eosinófilos, plasmócitos, histiócitos e um grau variável de fibrose. Mas atualmente o exame imunohistoquímico tem papel importante, não só na confirmação diagnóstica, como também na subclassificação e no diagnóstico diferencial com outras entidades histológicas como o Linfoma Anaplásico de Grandes Células (ALCL) e o Linfoma de grandes células B Rico em Células T.

Como neste estudo não foram realizados outros marcadores imunohistoquímicos excetuando o MIB 1, que faz parte do objetivo principal deste trabalho, as características histológicas foram os únicos critérios utilizados para seleção e subclassificação dos casos.

Os 53 casos selecionados assumiram distribuição percentual de Esclerose Nodular 48% (25/53), Celularidade Mista 28% (15/53), Depleção Linfocitária 13% (7/53) e Predominância Linfocitária 11% (6/53) (Gráfico

1). A Literatura mostra uma distribuição percentual em torno de 70% para o subtipo Esclerose Nodular, 20-25% para Celularidade Mista, 5% para Predominância Linfocitária e menos que 5% para a forma Depleção Linfocitária (Gráfico 2).

Alguns trabalhos tem mostrado que casos previamente subclassificados como Depleção Linfocitária, quando reavaliados e submetidos a exame imunohistoquímico têm mostrado ser na verdade Linfoma não-Hodgkin com morfologia anaplásica ou de grandes células pleomórficas (Kant JA, Hubbard SM, Longo DL *et al.*, 1986). Desta forma, o fato de neste estudo não realizarmos outros marcadores imunohistoquímicos que não o Ki 67, poderia permitir que casos alocados por nós neste subgrupo, na verdade, não pertencessem a ele. Sete casos (13%) foram subclassificados como Depleção Linfocitária mostrando um percentual bem maior do que o referido na literatura (< 5%) e fazendo com que este índice percentual do nosso trabalho seja questionável, como também vindo ressaltar a importância do exame imunohistoquímico para a subclassificação do Linfoma de Hodgkin.

Pelo mesmo fato do diagnóstico e subclassificação dos casos deste de Predominância Linfocitária ter sido puramente em bases morfológicas, deve-se considerar que poderia ocorrer de casos de Linfoma de Hodgkin Clássico, predominância Linfocitária estarem neste trabalho incluídos erroneamente neste subgrupo, o que explicaria o maior percentual encontrado neste trabalho (11%) em relação ao descrito na literatura (5%). Para o diagnóstico de certeza desta nova subcategoria do Linfoma de Hodgkin, a realização de marcadores imunohistoquímicos como o CD 30, CD 15 e CD 20 são necessários.

A maioria dos casos deste estudo (56,6%) mostraram um padrão baixo de positividade ao Ki 67 (= ou < 4 células positivas em 10 campos de grande aumento) o que poderia ser explicado pelo grande número de casos pertencerem ao subtipo esclerose nodular grau I da classificação da “British National Lymphoma Investigation” (BNLI), mostrando 75% ou mais dos nódulos contendo escassas CRS e proeminente estroma fibroso (Bennett MH, Maclennan KA, Easterling MJ *et al.*, 1983) (Maclennan KA, Bennett MH, Vaughan HB, 1992).

A avaliação estatística dos dados através dos exames de Qui-quadrado e Prova exacta de Fisher não mostrou diferença significativa entre os grupos. Nenhum padrão característico de expressão ao Ki 67 foi observado em qualquer dos subtipos histológicos do Linfoma de Hodgkin, fazendo com que a realização do marcador MIB 1 (Ki 67) neste estudo não auxiliasse na subclassificação dos 53 casos selecionados em seus respectivos subgrupos.

A realização de marcadores imunohistoquímicos como o CD 15, CD 30, CD 20, EMA e ALK é recomendável em casos de suspeita de Linfoma de Hodgkin, visto que os mesmos, em conjunto com os achados histológicos, permitem melhor acurácia diagnóstica, subclassificação e exclusão dos diagnósticos diferenciais.

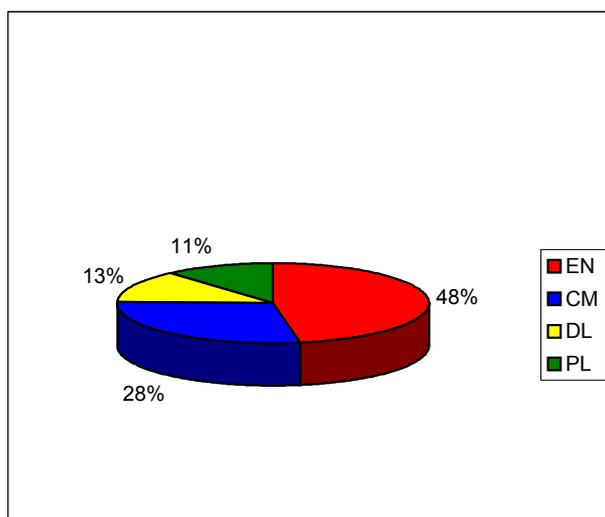


Figura 11 - Percentual de distribuição dos 53 casos de Linfoma de Hodgkin analisados

EN = Esclerose Nodular; CM = Celularidade Mista; DL = Depleção Linfocitária; PL = Predominância Linfocitária

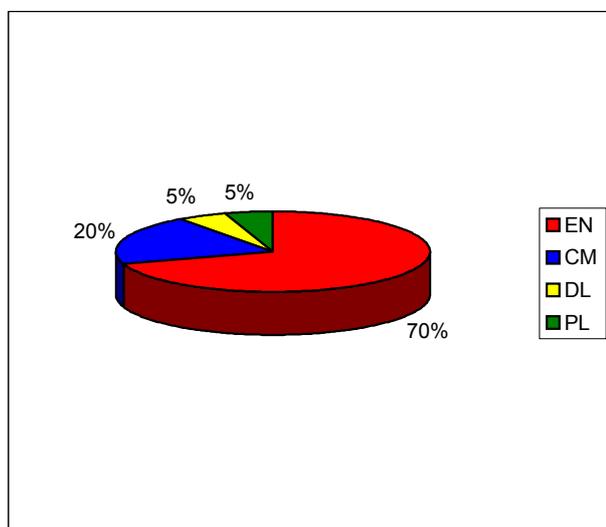


Figura 12 - Percentual de distribuição dos casos de Linfoma de Hodgkin na Literatura

EN = Esclerose Nodular; CM = Celularidade Mista; DL = Depleção Linfocitária; PL = Predominância Linfocitária

CONCLUSÃO

A avaliação dos 53 casos de Linfoma de Hodgkin do Hospital do câncer de Pernambuco não mostraram diferença significativa entre os vários subtipos quando submetidos a reação de imunohistoquímica para o Ki67, não sendo desta forma este marcador de atividade proliferativa celular útil na caracterização e subclassificação desta entidade nosológica.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof Dr. Adonis Carvalho** pela acolhida em seu serviço,
disponibilizando o uso de material de seu arquivo.

Ao **Prof Dr. Luciano Montenegro** pela colaboração
na realiação da parte técnica deste trabalho.

As pessoas que formam o Departamento de Patologia do Hospital do
Cancer de Pernambuco agradeço todo apoio e colaboração recebida.

À Sonia Carvalho e Zenaide pelo suporte oferecido e pelo trabalho que
realizam junto a coordenadoria do Mestrado de Anatomia Patológica da
UFPE.

REFERÊNCIAS

Abele MC, Valente G, Kerim S, Navone R, Oneste P, Chiusa L, Resegotti L, Palestro G (1997): Significance of cell proliferation index in assessing histological prognostic categories in Hodgkin's Disease. An immunohistochemical study with Ki67 and MIB-1 monoclonal antibodies. *Haematologica* 82(3): 281-285

Bennett MH, Maclennan KA, Easterling MJ, Vaughan HB, Jelliffe AM, Vaughan HG (1983). The prognostic significance of cellular subtypes in nodular sclerosing Hodgkin's disease: an analysis of 271 non-laparatomised cases (BNLI report n° 22). *Clin Radiol* 34:497-501.

Brousset P, Knecht H, Rubin B, Drouet E, Chittal S, Meggetto F, Saati TA, Bachmann E, Denoyel G, Sergeant A, Delsol G (1993): Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's Disease. *Blood* 82:872-876.

Butler JJ, Hicks EB (1966): Natural history of Hodgkin's Diseases as related to its pathologic picture. *Cancer* 19:317-344

Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, Henderson ES, Green MR, Gottlieb A, Peterson BA (1992): Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *New England Journal of Medicine* 327(21): 1478-1484

Colby TV, Hoppe RT, Warnke RA(1981) Hodgkin's disease: a clinicopathologic study of 659 cases. *Cancer* 49:1848-1858

Coles FB, Cartun RW, Pastuszak WT (1988). Hodgkin's disease, lymphocyte-predominant type: immunoreactivity with B-cell antibodies. *Mod Pathol* 1:274-278.

Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K, Jänicke F, Nathrath W, Schmitt M, Graeff H, Höfler H (1997). Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB-1 (ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br J Cancer* 75:1525-1533.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715.

Grufferman SL, Delzell E (1984): Epidemiology of Hodgkin's Disease. *Epidemiol Rev* 6:76 - 106.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peters C, Falini B, Gatter KC, Grogan TM, Issacson PG, Knowles DM, Mason DY, Muller-Hermelink HK, Pileri SA, Piris MA, Ralfkiaer E and Warnke (1994): A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84:1361.

Hsu SM, Jaffe ES (1984). Leu M1 and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol* 82:29-32.

Jackson H Jr, Parker F Jr (1944): Hodgkin's Disease. General Considerations. *N Engl J Med* 230:1-8.

Josting A, Wolf J, Diehl V (2000). Hodgkin disease: prognostic factors and treatment strategies. *Curr Opin Oncol* 12:403-411.

Kant JA, Hubbard SM, Longo DL, Simon RM, De Vita VT, Jaffe ES (1986): The pathologic and Clinical heterogeneity of lymphocytes-depleted Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol* 4:284-294.

Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewsky K (1996): Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184:1495-1505.

Kuppers R, Rajewsky K (1998): The origin of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Annu Rev Immunol* 16:471-493

Kuppers R, Brauning A, Muschen M, Distler V, Hansmann ML, Rajewsky K (2001): Evidence that Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin disease do not represent cell fusions. *Blood* 97:818-821

Lukes RJ (1971): Criteria for involvement of lymph node, bone marrow, spleen and liver in a Hodgkin's Diseases. *Câncer Res* 1755-1767

LuKes RJ, Butler JJ, Hicks EB (1966): Natural History of Hodgkin's Disease as related to its pathologic Picture. *Câncer* 19:317-344.

Lukes RJ, Craver LF, Hall TC, Rappaport H, Rubin P. Report of the nomenclature Committee. *Cancer Res* 1966; 26: 1311

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

Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I, Lammert H, Demel G, Theil J, Wirth T, Stein H (2000). Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 95: 1443-1450.

Mason DY, Banks PM, Chan J (1994): Nodular Lymphocyte predominance Hodgkin's Disease. A distinct Clinicopathological entity. *Am J Surg Pathol* 18:526-530.

McCunney RJ (1999). Hodgkin's Disease, Work, and the Environment: A Review. *Jornal of Occupational and Environmental Medicine* Vol 41 Number 1.

Mochen C, Giardini R, Costa A, Silvestrini R (1997). MIB-1 and S-phase cell fraction predict survival in non-Hodgkin's lymphomas. *Cell Prolif* - 30(1): 37-47

Mourad W, Alsohaibani MO, Saddik M, Bazerbashi S (1998): Epstein-Barr virus expression in Hodgkin's Disease: correlation with histologic subtypes and T and B Lymphocyte. *Ann Saudi Med* 18(4) 296-300.

Muschen M, Rajewsky K, Brauninger A, Baur AS, Oudejans JJ, Roers A, Hansmann ML, Kuppers R (2000): Rare occurrence of a classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med* 191:387-394.

Narita M, Nakao K, Ogino N, Nakahara M, Onishi A, Tsujimoto M. (1998) Independent prognostic factors in breast cancer patients. *Am J Surg.* 175: 73-75

Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Rowe M, Young LS (1991): Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337:320-322.

Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani PL, Piccaluga PP, Pileri Jr A, Giunti M, Bolis GB, Stein H (2002): Hodgkin's Lymphoma : the pathologist's viewpoint . J Clin Pathol; 55:162-176.

Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF (eds) (1999). SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999, http://seer.cancer.gov/csr/1973_1999/sections.html

National Cancer Institute. Bethesda, MD

Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H (2000). Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-sternberg cells of classic Hodgkin disease. Blood 95:3020-3024.

Stein H, Mason DY, Gerdes J, O'connor N, Waincoat J, Pallesen G, Gatter K, Falini B, Delsol G, Lemke H, Schwarting R, Lennert K (1985). The expression of Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. Blood 66: 848-858.

Tirelli U, Errante D, Dolcetti R, Gloghini A, Serraino D, Vaccher E, Franceschi S, Boiocchi M, Carbone A (1995): Hodgkin's disease and human immunodeficiency virus infection: clinicopathologic and virologic features of 114 patients from the Italian Cooperative Group on AIDS and tumors. *J Clin Oncol* 13:1758.