

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

**AVALIAÇÃO DO NÍVEL SÉRICO DE IL-6, IL-10 E IL-13 ANTES
E APÓS O TRATAMENTO DO LINFOMA DE HODGKIN
CLÁSSICO**

RAFAEL DEZEN GAIOLLA

ORIENTADOR: PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA
CO-ORIENTADORA: PROF^A. DR^A. LÍGIA NIÉRO-MELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU, SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Sulamita Selma Clemente Colnago* – CRB 8/4716

Gaiolla, Rafael Dezen.

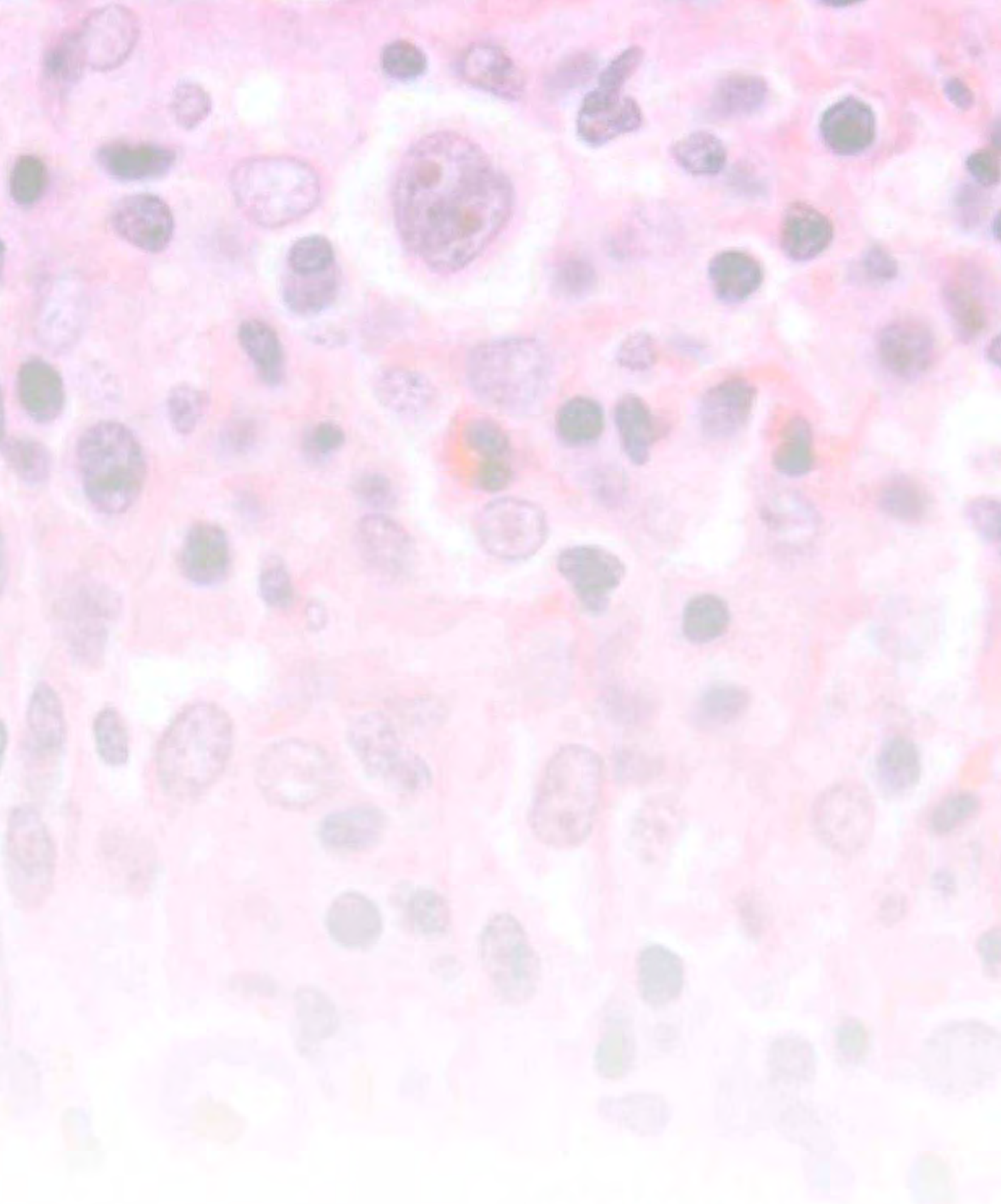
Avaliação do nível sérico de IL-6, IL-10 e IL-13 antes e após o tratamento do Linfoma de Hodgkin clássico / Rafael Dezen Gaiolla. – 2008.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

1. Hodgkin, Doença de.

CDD 616.99446

Palavras chave: Linfoma de Hodgkin; Vírus Epstein-Barr; Citocinas; Imunobiologia; ELISA



Dedicatória

*A Deus, por manter meu caminho
sempre iluminado.*

*À Paula, que faz a minha vida
simplesmente completa.*

*Aos meus filhos Sofia e Guilherme,
minha dose-dupla diária de amor e
felicidade.*

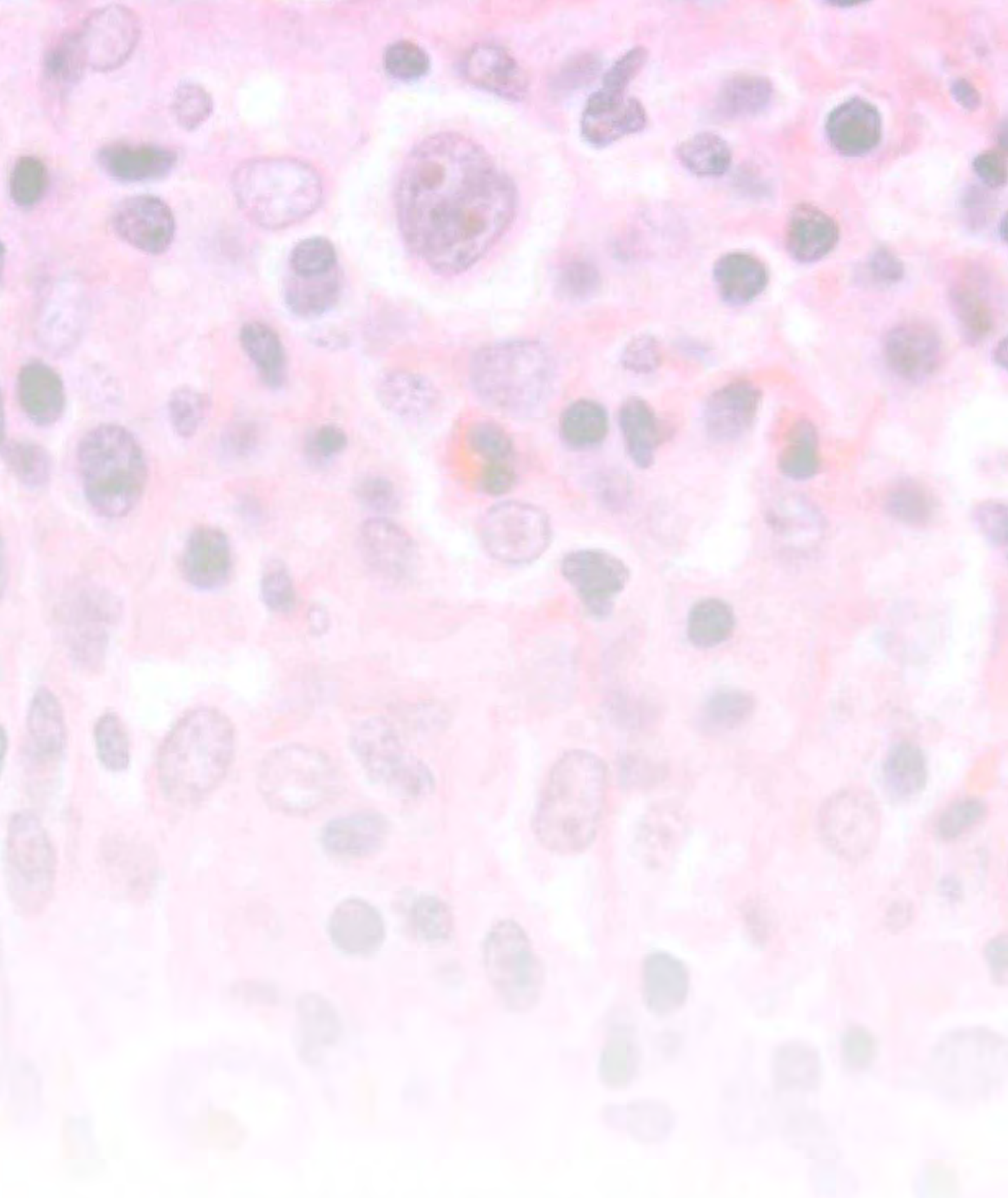
*Aos meus Pais, Antonio e
Teresinha, pela dedicação e amor
inesgotáveis, e por me ensinarem
a acreditar em meus sonhos,
sempre.*

Ao Paulo, Paula e Raquel, pela amizade, cumplicidade e, acima de tudo, por sempre estarem por perto, mesmo que de longe.

À minha querida tia Dica, por 32 anos de amor e dedicação incansáveis.

Ao Coto, Ângela, Fábio, Denise, Otávio e Marcela, pelo amor e carinho a mim dedicados.

Ao amigo Luis Paulo Beltrame, por me incentivar a escolher a Hematologia.



Agradecimentos Especiais

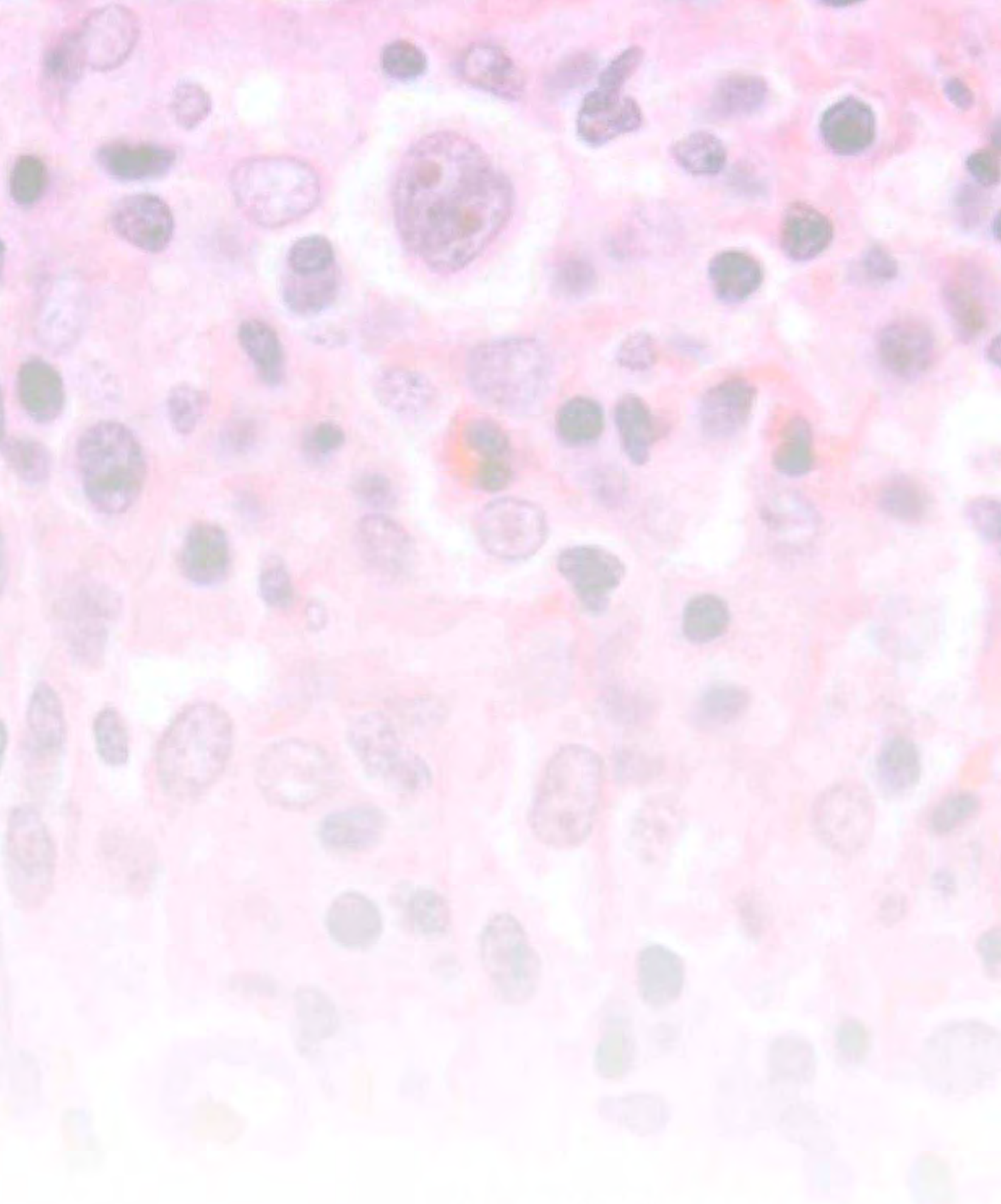
Ao Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira, pela disponibilidade em me orientar e pela oportunidade de vivenciar a pesquisa científica realizada com grande competência e dedicação.

À Prof^a. Dr^a. Lígia Niéro-Melo, por quem tenho grande admiração. Agradeço por todos os ensinamentos, oportunidades e por estar sempre presente nas minhas conquistas pessoais e profissionais.

Ao Dr. Vergílio Antonio Rensi Colturato, por não medir esforços em viabilizar a realização desse trabalho e por sempre, sem exceções, apoiar minhas decisões profissionais. Tenho como exemplo a perseverança e amor com os quais realiza seu trabalho.

Ao Dr. Mair Pedro de Souza, pela amizade e por seu exemplo de dedicação e competência profissional.

Ao Prof. Adj. Sérgio Alberto Rupp de Paiva, ao Dr. Marcos Ferreira Minicucci e à Dra. Suzana Erico Tanni Minamoto, pelo auxílio fundamental na realização da análise estatística desse trabalho. Meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade, paciência e amizade.



Agradecimientos

Aos membros do Laboratório de Patologia Molecular da FMB – UNESP:

*Alice Silva Gonçalves
Ana Paula Ferraz da Silva
Suzane Ramos da Silva
Leila Giron
Ana Rachel Oliveira Leda
Danielle Amorim
Celene Maria C. Gandin
Marcos Roberto Franchi
Luis Fernando Franchi*

A participação de vocês foi fundamental para que esse trabalho se tornasse realidade. A todos, meus sinceros agradecimentos.

Aos meus queridos amigos,

Andréa Miranda Pedro

Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida

David Nicolleti Gumieiro e Lisa Milaré Gumieiro

Marcos Ferreira Minicucci e Fernanda Chiuso Minicucci

Fernando Seara Cordaro e Larissa Chambô Cordaro

Palavras são insuficientes para demonstrar a importância que vocês têm em minha vida. Obrigado por estarem sempre ao meu lado.

Aos médicos do Departamento de Oncologia Clínica e Hematologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú:

Dra. Ana Lúcia Coradazzi

Dra. Andiará Vasconcellos Cantarelli Boneto Pires

Dra. Andréa Miranda Pedro

Dr. Carlos Augusto de Mendonça Beato

Dra. Cláudia Teresa de Oliveira

Dr. Éderson Roberto de Mattos

Dr. Fabrício Pascolat

Dr. Gustavo Fernando Veraldi Ismael

Dr. José Getúlio Martins Segalla

Dr. Marcos Augusto Mauad

Dr. Mair Pedro de Souza

Dra. Maura Rosane Valério Ikoma

Dr. Vergílio Antonio Rensi Colturato

É uma honra poder trabalhar com vocês.

Obrigado pela oportunidade da convivência pessoal e profissional, e pelos anos de aprendizado.

Aos colegas

Prof^o. Dr^a. Lucilene Silva Ruiz e Resende, por todo apoio e incentivo à realização deste trabalho e pelo grande auxílio durante a prova de qualificação.

Prof^o Dr^a. Maria Aparecida Custódio Domingues pela revisão histopatológica dos casos desse estudo.

Prof^o. Dr^a. Alexandrina Sartori, por contribuir para a melhoria desse trabalho durante a prova de qualificação.

Dr. Íverson Xavier Duarte, pela disponibilidade e competência no auxílio à revisão histológica dos casos.

Aos médicos residentes da Disciplina de Hematologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, pela assistência prestada aos pacientes e auxílio nas coletas de dados e materiais.

Aos funcionários do Serviço de Hematologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, pela disponibilidade, dedicação e atenção dispensadas em todas as etapas da realização desse estudo.

Ao Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, na pessoa do diretor Dr. José Mauro Zanini, que viabilizou a realização do grupo-controle deste estudo.

*Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da FMB – UNESP, em especial a **Sra. Zezé**, pela colaboração na coleta das amostras de sangue dos pacientes.*

*Ao Departamento de Patologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, na pessoa do **Dr. Francisco Carlos Quevedo**, pela disponibilização do material necessário para a realização deste estudo.*

*Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo Bacchi**, pela disponibilização de material necessário para a complementação desse estudo.*

A todos os funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu que colaboraram para a realização desse trabalho.

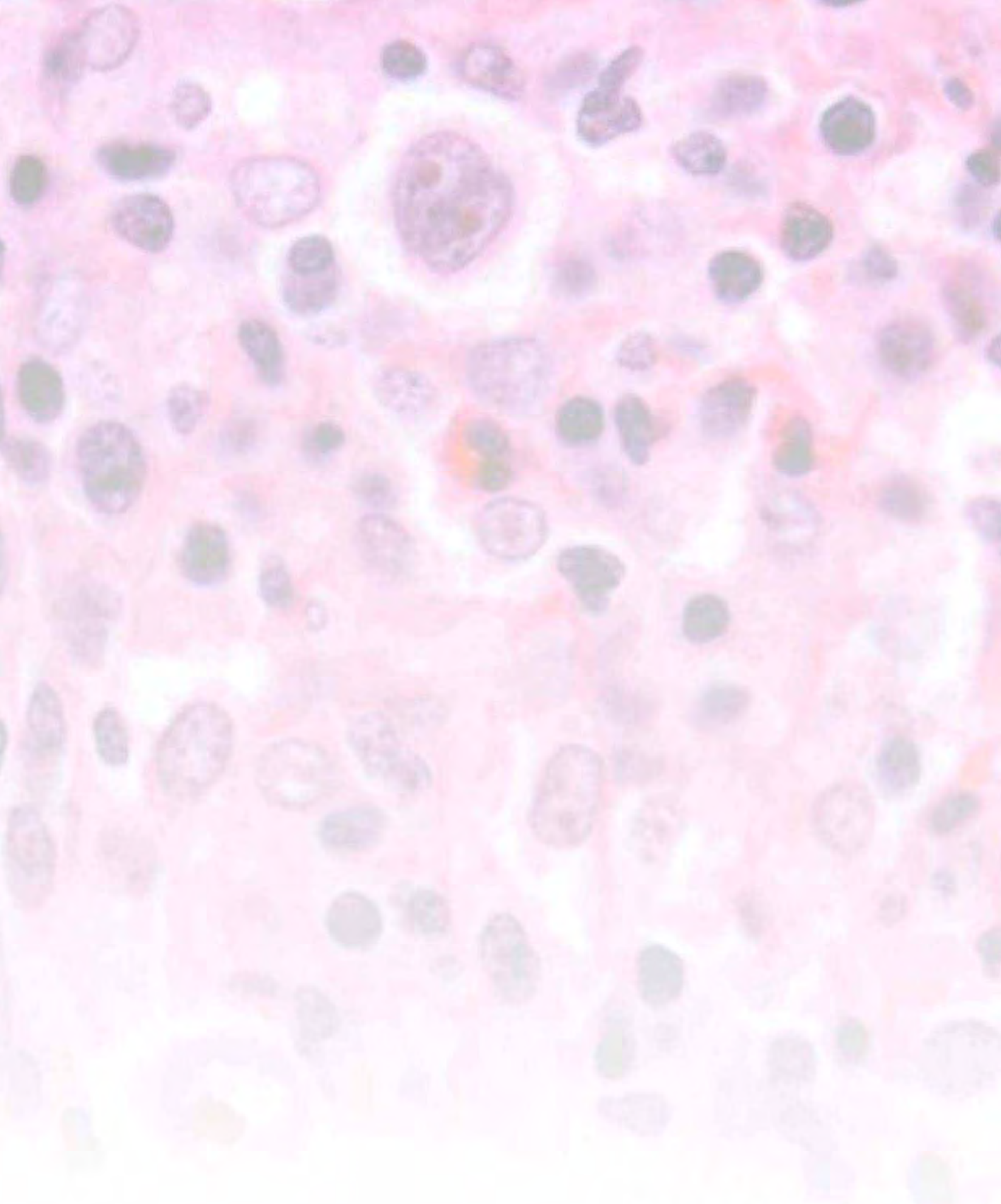
Aos funcionários da Seção Técnica de Quimioterapia da FMB – UNESP, que colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

Aos funcionários da Pós-Graduação e da Biblioteca: Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Andrea Paula Longo Devidé, Lillian Cristina Nadal Bianchi Nunes, Regina Célia Spadin, Nathanael Pinheiro Salles, Sulamita Selma Colnago e Tânia Alice de Andrade, pela competência, prontidão e gentileza com as quais realizam seu trabalho.

*Às funcionárias do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital Amaral Carvalho de Jaú: **Marcimara, Marina e Fátima**, pelo auxílio no processamento e estocagem das amostras de soro.*

Aos pacientes, coadjuvantes dessa conquista, que mesmo no momento de insegurança e fragilidade de seu diagnóstico, foram grandiosos em aceitar participar do estudo. A todos vocês, minha eterna gratidão e admiração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro dispensado a este trabalho.



Sumário

1. Revisão da Literatura.....	18
1.1. Aspectos gerais do Linfoma de Hodgkin.....	19
1.2. Vírus de Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin.....	23
1.3. Aspectos clínicos do Linfoma de Hodgkin.....	26
1.4. Citocinas e Linfoma de Hodgkin.....	32
Referências Bibliográficas.....	37
Artigo Científico.....	49
Resumo.....	51
Abstract.....	53
1. Introduction.....	55
2. Design and Methods.....	58
2.1. Patients.....	58
2.2. Disease staging and laboratory evaluation.....	58
2.3. Immunohistochemistry and EBV status.....	59
2.4. Determination of interleukin serum levels.....	60
2.5. HL treatment.....	60
2.6. Statistical analysis.....	61
3. Results.....	62
3.1. Association of serum interleukin and disease features.....	63
4. Discussion.....	67
References.....	72
Anexos.....	80



1. Revisão da Literatura

1.1 Aspectos gerais do Linfoma de Hodgkin

O Linfoma de Hodgkin (LH) foi inicialmente descrito em 1832 por Thomas Hodgkin, em seu trabalho intitulado *On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen*, no qual descreveu a autópsia de sete pacientes que apresentavam um processo expansivo primário de nódulos linfáticos e baço¹. Com base nessas observações, e acrescentando a descrição de novos casos, Samuel Wilks definiu o linfoma de Hodgkin como entidade nosológica em 1856, diferenciando-o de outras doenças associadas ao aumento de nódulos linfáticos². Carl Sternberg (1898)³ e Dorothy Reed (1902)⁴, independentemente, descreveram a célula diagnóstica da doença, que foi denominada célula de Reed-Sternberg. Tipicamente, essa é uma célula gigante e multinucleada, mas formas mononucleares também foram descritas, denominadas células de Hodgkin.

A característica histopatológica peculiar do linfoma de Hodgkin é a identificação de população escassa das células neoplásicas de Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS) em meio a infiltrado heterogêneo de células inflamatórias constituído por linfócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e plasmócitos que, usualmente, constituem mais de 90% do tumor^{5,6,7}, (Figura 1).

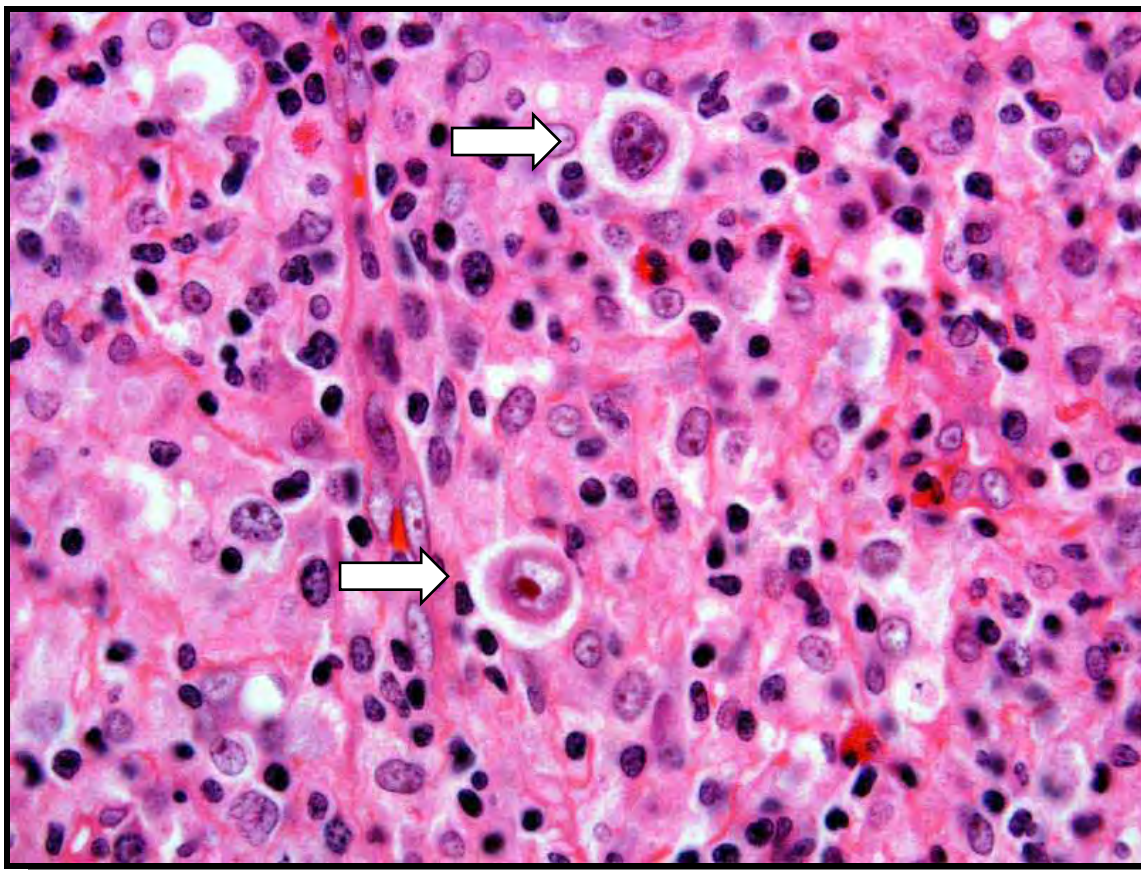


FIGURA 1 - Aspecto histopatológico do Linfoma de Hodgkin clássico, subtipo celularidade mista. Notar a presença de duas células Hodgkin/Reed-Sternberg (setas) em meio à população heterogênea de células inflamatórias (hematoxilina & eosina, 400x)

A origem das células H-RS permaneceu elusiva por décadas, principalmente em virtude de sua escassez no tecido tumoral, o que inviabilizava sua análise adequada. Sabe-se que essas células apresentam um padrão imunofenotípico incomum, distinto de qualquer célula normal do sistema hematopoiético. O advento da técnica de microdissecção associada a análises moleculares permitiu a identificação de rearranjos dos segmentos gênicos codificadores para a região variável da molécula de imunoglobulina em praticamente todas as células H-RS avaliadas. Desse modo foi constatado que as células H-RS se originam de linfócitos B do centro germinativo do tecido

linfóide na maioria dos casos de LH^{8,9}. Por outro lado, em cerca de 1 a 2% dos casos elas apresentam algumas características de linfócitos T¹⁰.

Em mais de 98% dos casos de LH é observada a expressão de CD30, glicoproteína pertencente à superfamília dos receptores para o fator de necrose tumoral (*Tumoral Necrosis Factor* – TNF), geralmente com padrão de imunocoloração positiva na membrana e/ou perinuclear. Ainda que inespecífico, outro marcador freqüente é o CD15, expresso em aproximadamente 80% dos casos de LH. O antígeno leucocitário comum CD45, bem como marcadores característicos de linhagem linfóide B geralmente não são expressos. Entretanto, aproximadamente 25% dos casos de LH exibem expressão de CD20. Também são expressas pelas células tumorais outras proteínas comumente detectadas em diferentes tipos celulares, incluindo células dendríticas (fascina, TARC), granulócitos e monócitos (CD15), plasmócitos (MUM-1, CD138), linfócitos B (Pax-5) e linfócitos ativados (CD30), caracterizando um imunofenótipo bastante complexo e peculiar^{7,11}. Para o diagnóstico de rotina do LH, é recomendada a pesquisa de pelo menos 5 marcadores linfóides nas células neoplásicas: CD45, CD30, CD15, CD20 e CD3.

Estudos que avaliam a expressão gênica em linhagens de células H-RS revelam supressão ou expressão reduzida de moléculas importantes da via de sinalização deflagrada pelo receptor de células B (*B Cell Receptor* - BCR)¹², incluindo proteínas com atividade tirosina-quinase e fatores de transcrição. Por esse motivo, assume-se que essas células têm comprometido o programa de expressão característico de células B¹³. Nesse sentido, é interessante notar que as células H-RS expressam o fator de

transcrição Notch-1, que geralmente se associa com a diferenciação de células T, em detrimento da expressão de fatores associados à diferenciação de células B⁸.

Alguns mecanismos responsáveis pela transformação celular no LH já estão bem estabelecidos. A instabilidade genômica da célula H-RS é documentada pela presença de alterações citogenéticas em virtualmente todos os casos da doença, notadamente alterações cromossômicas numéricas. Adicionalmente, é verificada ativação constitutiva de vias importantes de sinalização intracelular, particularmente as que convergem para a ação de fatores de transcrição da família NFκB, cuja expressão proporciona menor susceptibilidade à apoptose, marcante nas células H-RS⁸.

O LH representa aproximadamente 1% de todas as neoplasias malignas nos EUA e cerca de 10% do total dos linfomas. Segundo informações do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (*National Cancer Institute – NCI*) estima-se que em 2008 sejam diagnosticados naquele país aproximadamente 8.220 novos casos da doença (4.400 homens e 3.820 mulheres), que deve responder por 1.350 óbitos no período¹⁴. O LH acomete homens numa frequência um pouco maior que mulheres (razão 1,3:1 a 1,4:1) apresentando padrão bimodal de distribuição etária nos países desenvolvidos, com o primeiro pico observado na terceira década de vida e o segundo após a quinta década¹⁵. Nos países em desenvolvimento, por outro lado, predomina a incidência na infância, com pico entre 7 e 12 anos^{7,16}. Infelizmente dados epidemiológicos recentes sobre o LH no Brasil são escassos.

Conforme proposto em 1994 na Classificação Européia e Americana Revisada de Linfomas (*Revised European-American Lymphoma -*

REAL), e recentemente adotado na classificação de neoplasias hematopoéticas da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO), o LH é dividido em dois grupos principais: o LH clássico e LH predomínio linfocítico nodular (LH-PLN)^{7,17}. Casos de LH clássico são ainda subdivididos em LH Esclerose Nodular (LH-EN), LH Celularidade Mista (LH-CM), LH Rico em Linfócitos (LH-RL) e LH Depleção Linfocítica (LH-DL). O LH clássico e LH-PLN diferem quanto ao comportamento clínico, histopatologia, imunofenótipo, mutações nos genes que codificam para cadeias de imunoglobulinas e na frequência de infecção pelo vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus* - EBV)^{18,19}. De fato, há evidências suficientes para se considerar o LH-PLN uma entidade distinta do LH clássico^{20,21}. No presente estudo, serão discutidos apenas os aspectos etiopatogenéticos e clínicos do LH clássico, doravante denominado simplesmente LH.

1.2 Vírus de Epstein-Barr no Linfoma de Hodgkin

Vários estudos sugerem participação do EBV na etiopatogenia de parcela variável dos casos de LH. Trata-se de um vírus da família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*, que infecta mais de 90% da população mundial. Após a infecção, o EBV persiste infectando os linfócitos B do indivíduo de forma latente. Na maioria dos casos, a infecção tem evolução benigna e oligossintomática; em poucos indivíduos, entretanto, o vírus propicia o desenvolvimento de neoplasias malignas, principalmente linfomas de linhagem B, como é o caso do LH.

A ligação do EBV à superfície de linfócitos B faz-se pela interação entre a principal glicoproteína do envelope viral, a gp350, com a molécula CD21, receptor linfóide para o fragmento C3d do sistema complemento. Outras glicoproteínas são requeridas para a entrada do vírus na célula, incluindo moléculas da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC). Após a entrada no linfócito, o genoma viral é transportado para o núcleo e se mantém em conformação circular, denominada episómo²².

Durante os programas de infecção latente pelo EBV, entretanto, apenas um pequeno número dos genes virais é expresso. A expressão de proteínas virais é restrita ao mínimo requerido para manutenção da infecção, dificultando o reconhecimento das células infectadas pelo sistema imunológico²². Métodos moleculares permitem detectar o genoma do EBV ou proteínas virais nas células H-RS em cerca de 40 a 50% dos casos de LH, notadamente LH-CM^{23, 24, 25,26}. As células neoplásicas do LH, latentemente infectadas pelo vírus, comumente expressam dois pequenos RNAs não-codificadores denominados EBERs 1 e 2 (*EBV-encoded RNAs*), cinco proteínas nucleares, os antígenos nucleares 1, 2, 3A, 3B e 3C (*Epstein-Barr virus Nuclear Antigens* - EBNA), e duas proteínas de superfície, as proteínas latentes de membrana 1 e 2a (*Latent Membrane Proteins* - LMPs).

Como os transcritos EBER-1 e EBER-2 não codificam proteínas, sugere-se que sua participação na transformação celular induzida pelo EBV esteja relacionada à modulação da resposta ao interferon e resistência à apoptose^{22, 27}. O EBNA-1 participa da manutenção do episóma

viral, além de ser necessário para a replicação do vírus nas células infectadas. O EBNA-2 regula a expressão gênica de diferentes produtos do EBV, aumentando a expressão de LMPs, bem como de proteínas celulares que participam da proliferação e eventual transformação de células B. Membros da família EBNA-3 (EBNA-3A, 3B e 3C) também regulam a expressão de genes celulares²². A LMP-1, por outro lado, mimetiza moléculas da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor* – TNFR). Esta é considerada a mais importante oncoproteína do EBV e sua expressão é capaz de ocasionar a transformação de linfócitos *in vitro*²⁸. LMP-1 induz a transdução de sinais que simulam a ativação da molécula CD40, deflagrando o estímulo da via NF-κB, que regula a expressão de moléculas de adesão, a produção de citocinas, a proliferação e a sobrevivência de linfócitos B. A LMP-2a é análoga ao BCR e também atua por meio de sinalização intracelular relacionada à sobrevivência da célula infectada. Adicionalmente, impede a reativação do EBV nas células com infecção latente por meio de bloqueio da fosforilação de enzimas com atividade tirosina-quinase. Tendo em vista o repertório de atividades dos produtos do EBV, sugere-se que algumas dessas proteínas virais desempenham papel decisivo no desenvolvimento do LH, atuando como fatores estimuladores da proliferação celular, fatores anti-apoptóticos²⁴ ou agentes moduladores da resposta imunológica^{29,30}.

1.3 Aspectos clínicos do Linfoma de Hodgkin

O diagnóstico e a classificação do LH são baseados no estudo anatomopatológico, complementado pela imunoistoquímica. A forma mais comum de apresentação clínica da doença é o surgimento de linfonodomegalia indolor, geralmente em região cervical ou supraclavicular (em 60 a 80% dos casos), axilar (em 30 a 35% dos casos), ou massa mediastinal identificada por exames de imagem (em 60% dos casos). A região inguinal é acometida em menor frequência (5 a 15% dos casos)³¹. O acometimento mediastinal pode estar associado a massas volumosas com poucos sintomas clínicos, sendo incomum o paciente apresentar manifestações indicativas de síndrome da veia cava superior.

O LH-EN e o LH-CM tendem a apresentar um padrão centrípeto de acometimento dos nódulos linfáticos: regiões cervical, mediastinal e para-aórtica. Por outro lado, enquanto o LH-EN costuma se apresentar como doença supradiaphragmática, o LH-CM geralmente se revela como doença subdiaphragmática disseminada, sendo comum o acometimento de órgãos abdominais. No LH-RL e no LH-PLN, o padrão inicial de acometimento é de nódulos linfáticos periféricos, principalmente cadeias cervical, submandibular, axilar e inguinal. O LH-DL apresenta-se geralmente com acometimento de linfonodos retroperitoneais e órgãos abdominais, sendo mais comum, nesse subtipo, a infiltração de medula óssea.

Aproximadamente 30% dos casos de LH revelam sintomas constitucionais ao diagnóstico, incluindo febre, perda de peso e sudorese

noturna (sintomas B) ³². A febre tende a aparecer no período vespertino e, embora seja rara, a febre do padrão Pel-Ebstein, quando identificada, favorece o diagnóstico de LH. Outros sintomas inespecíficos podem ser encontrados, incluindo prurido cutâneo (em 10 a 15% dos casos), fadiga e, embora incomum, pode ocorrer dor nas áreas acometidas pelo linfoma, poucos minutos após a ingestão de bebidas alcoólicas. Manifestações pára-neoplásicas cutâneas, neurológicas, renais e metabólicas são raras, mas podem preceder o diagnóstico da doença ³³.

A primeira avaliação do paciente com LH deve ser criteriosa, pois dela depende a definição da melhor estratégia terapêutica a ser empregada. Além de história clínica e exame físico detalhados, é imprescindível o estadiamento da doença, baseado em tomografia computadorizada contrastada das regiões cervical, torácica, abdominal e pélvica, análise de aspirado e biópsia bilateral de medula óssea, hemograma e velocidade de hemossedimentação (VHS) e perfil bioquímico sérico, incluindo função renal, função hepática e desidrogenase láctica (DHL). Também contribuem para o estadiamento, a cintilografia de corpo inteiro com Gálio ³³ e a tomografia por emissão de pósitrons acoplada à tomografia computadorizada (*Positron Emission Tomography/Computerized Tomography* - PET-CT). O PET-CT é preconizado ao diagnóstico e, para determinação de doença residual, ao término do tratamento. Esse exame tem demonstrado superioridade em relação à cintilografia, pois modifica o estadiamento clínico em aproximadamente 20% dos casos ^{34, 35}. Estudo recente demonstrou sensibilidade de 100% e especificidade de 90,7% do PET-CT para reavaliação

pós-tratamento³⁶. Seu alto custo, entretanto, inviabiliza seu emprego de forma rotineira.

O curso clínico do LH está diretamente relacionado à sua classificação histopatológica, ao grau de extensão da neoplasia, à classificação histopatológica da doença e a alguns fatores prognósticos adversos bem estabelecidos. As taxas de cura são elevadas nos estadios precoces, com sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) acima de 95%^{37, 38}. Esses índices são particularmente relevantes tendo em vista que o LH acomete, predominantemente, população jovem e economicamente ativa³⁹. Por outro lado, embora as taxas de resposta inicial possam alcançar 80% nos estadios avançados, de maneira geral, é observada redução significativa da SG (aproximadamente e 65% em 5 anos)^{37, 40}. Entre 10 e 15% dos pacientes com doença localizada e 25 a 30% dos pacientes com doença avançada apresentam falha terapêutica ou recaída após tratamento inicial. Nesses casos, a SLD em 5 anos varia de 18% a 45%, de acordo com o número de fatores adversos identificados^{41, 42, 43}.

O estabelecimento das diretrizes do tratamento do LH é sincrônico ao desenvolvimento da quimioterapia e da radioterapia. No início do século XX, o LH era considerado uma doença fatal, de modo que as abordagens terapêuticas vigentes tinham objetivo paliativo explícito. Somente por volta de 1960 foi possível modificar significativamente a história natural da doença, graças à demonstração de sensibilidade da neoplasia ao tratamento radioterápico e, subseqüentemente, à observação de quimiossensibilidade à

mostarda nitrogenada, possibilitando a cura de parcela importante dos pacientes com LH.

Entre 1965 e meados de 1980, avanços importantes no tratamento do LH consolidaram princípios fundamentais para o tratamento das doenças oncológicas de maneira geral. A radioterapia exclusiva era a principal modalidade para o tratamento do LH na década de 70. Na década de 80, a aplicabilidade da poliquimioterapia tornou-se evidente com o estabelecimento de esquemas eficazes, como MOPP (mostarda nitrogenada, vincristina, procarbazina e prednisona) e ABVD (doxorubicina, bleomicina, vimblastina e dacarbazina)⁴⁴, e foi impulsionada pela necessidade de desenvolvimento de esquemas sem os efeitos tóxicos tardios da radioterapia. Desde então, a evolução do tratamento do LH tem sido caracterizada pela substituição da radioterapia em campo estendido associada à quimioterapia com agentes alquilantes, por esquemas quimioterápicos baseados em antraciclina, associados ou não à radioterapia restrita ao campo envolvido e com doses reduzidas. Adicionalmente, foi consolidado o benefício do transplante autólogo de células progenitoras hematopoiéticas em casos de doença recidivada e esquemas quimioterápicos mais agressivos têm sido propostos para o tratamento em primeira linha do LH avançado^{42,45,46,52}.

A longa sobrevivência dos pacientes curados tem possibilitado a observação de problemas possivelmente relacionados à terapia anti-neoplásica, incluindo cardiotoxicidade, infertilidade, menopausa precoce e aumento no risco para desenvolvimento de neoplasias secundárias^{37, 39, 47}. Assim, atualmente dois princípios básicos regem a busca pelo tratamento

antineoplásico ideal: atingir o máximo de eficácia terapêutica com a menor toxicidade possível.

Estudos recentes têm buscado a identificação de marcadores clínicos, histopatológicos e moleculares capazes de estratificar, mais adequadamente, os indivíduos que apresentem LH de evolução clínica semelhante. Uma vez definidos, esses marcadores podem propiciar o delineamento da estratégia terapêutica mais apropriada para pacientes nos estadios precoces, com diminuição nos efeitos adversos a médio e longo prazos, além de indicar, com maior segurança, o emprego de esquemas mais efetivos para pacientes em estadios avançados ^{40, 48, 49}.

Com base no estadiamento e prognóstico, no momento do diagnóstico do LH, é possível separar os pacientes em três grupos, definidos de acordo com parâmetros clínicos, biológicos e laboratoriais. Apesar de pequenas diferenças entre os critérios estabelecidos pelas escolas Européia e Americana ⁵⁰, de maneira geral são considerados fatores prognósticos desfavoráveis o sexo masculino, a idade superior a 45 anos, a presença de doença volumosa (massa superior a 10 cm de diâmetro) ou com localização mediastinal, a presença de sintomas B e VHS elevada. Pacientes com estadios I e II sem esses fatores são alocados no grupo estadio precoce com prognóstico favorável, enquanto aqueles que apresentam esses fatores são enquadrados no grupo de estadio precoce com prognóstico desfavorável (ou estadio intermediário). São considerados em estadio avançado os pacientes com LH estadios III e IV ^{37, 32, 51}, para os quais foram definidos marcadores prognósticos adicionais, úteis para a re-estratificação. Esses marcadores, que

compõem a Pontuação Prognóstica Internacional (*International Prognostic Score - IPS*), são: sexo masculino, idade superior a 45 anos, nível de hemoglobina, leucocitose, linfocitopenia, albumina sérica e estadios IV⁵².

Variações morfológicas e imunofenotípicas do LH, expressão de proteínas associadas a apoptose e a natureza e quantidade de linfócitos T no microambiente tumoral recentemente têm sido estudados como potenciais fatores prognósticos. Em 2007, Horning e colaboradores analisaram criticamente os atuais marcadores e índices de estratificação de risco para o LH. Os autores referem que todos foram capazes de prever quais pacientes apresentam risco elevado para falha terapêutica e recaída, notadamente a idade do paciente. No entanto, em todos os grupos de risco gerados foram identificados pacientes que se beneficiariam de terapêutica mais agressiva. Adicionalmente, pacientes com LH avançado com quatro ou mais fatores de risco representam um desafio em termos de tratamento, dadas as altas taxas de recaída⁵³. Considerando as informações disponíveis até o momento, nenhum marcador já descrito possibilita redirecionar a conduta terapêutica no LH com benefício para o paciente.

Tendo em vista esse cenário, atualmente muito se discute sobre a fisiopatologia e a imunobiologia do LH, notadamente acerca dos mecanismos que conferem maior sobrevivência à célula de H-RS. As células neoplásicas e as células inflamatórias reativas no LH compõem uma complexa rede de sinalização, característica do microambiente tumoral. Interações por meio de moléculas de adesão e a atividade parácrina de citocinas e fatores e crescimento propiciam a sobrevivência da célula H-RS; ao mesmo tempo, a

produção dessas moléculas é modulada pelas células neoplásicas do LH. Alguns trabalhos têm sugerido que alterações da resposta imunológica do paciente com LH podem se associar a características clínicas e histopatológicas da doença^{54, 55, 56}. Nesse sentido, merecem atenção os estudos que avaliam a influência dos níveis de diferentes citocinas (produzidas tanto pela célula de H-RS como pelo infiltrado inflamatório de permeio) na caracterização do LH e na evolução clínica dos pacientes acometidos pela doença.

1.4 Citocinas e Linfoma de Hodgkin

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas por diferentes tipos celulares com atividade no sistema imunológico. Essas moléculas atuam na regulação das imunidades inata e adquirida, além de contribuírem na hematopoiese e outros processos biológicos^{57, 58}. Citocinas são ativas em concentrações muito baixas e podem atuar de maneira autócrina, parácrina ou mesmo endócrina.

Em estudos de linhagens derivadas de LH e células H-RS primárias observou-se expressão aberrante de diversas citocinas e/ou seus receptores^{57, 59}. Acredita-se que citocinas produzidas pelas células H-RS podem ter papel importante na patogênese do LH, agindo como fator de crescimento autócrino para a célula tumoral, além de incitar e manter o infiltrado inflamatório intratumoral. Por outro lado, células inflamatórias não-

neoplásicas no tumor também produzem citocinas, que devem contribuir para a proliferação e sobrevivência das células H-RS ⁵⁹.

Diversas citocinas e quimiocinas têm sido estudadas no LH, e os resultados apontam para uma produção desbalanceada de moléculas do padrão de resposta humoral (perfil Th2) ^{55, 57}. Dentre as principais citocinas estudadas, merecem destaque a interleucina-6 ^{60, 61}, interleucina-10 ⁶² e interleucina-13 ⁶³.

A IL-6 possui ações variadas. Na imunidade inata, estimula a síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, contribuindo para os efeitos sistêmicos da inflamação; adicionalmente, estimula a produção de neutrófilos por ação em progenitores da medula óssea. Por outro lado, na imunidade adaptativa a IL-6 estimula o crescimento de linfócitos B e sua diferenciação em plasmócitos. É produzida predominantemente por fagócitos mononucleares, células do endotélio vascular e fibroblastos, além de algumas células T ativadas. Raramente é detectada no soro de indivíduos saudáveis; entretanto, os níveis séricos de IL-6 em pacientes com LH estão freqüentemente aumentados ao diagnóstico, fenômeno que já foi associado à menor sobrevida e doença avançada ⁶⁴. Seymor e colaboradores observaram correlação de níveis aumentados de IL-6 ao diagnóstico com variáveis prognósticas como VHS, β 2-microglobulina, hipoalbuminemia e presença de sintomas B, sugerindo papel da IL-6 no processo inflamatório sistêmico observado no LH ⁶⁵. Em estudos conduzidos por Cozen ⁶⁰ e Reynolds ⁶¹, níveis séricos elevados de IL-6 foram associados a um pior prognóstico e menor taxa de remissão completa. As células H-RS expressam também receptor para IL-6,

de modo que a citocina também pode atuar como fator de crescimento autócrino no LH ⁶⁰.

A IL-10 atua como inibidor de macrófagos e células dendríticas ativadas, com conseqüente diminuição dos níveis de IL-12, da expressão de moléculas co-estimuladoras e de moléculas de classe II do MHC. Essa citocina está envolvida no controle das reações da imunidade inata e da imunidade mediada por células, sendo produzida pelo próprio macrófago ativado e por linfócitos T. No LH, a IL-10 e seu receptor (IL-10R) são detectados nas células H-RS. Uma vez que a IL-10 aumenta a expressão de bcl-2 e protege células normais da apoptose induzida por fármacos, acredita-se que níveis elevados de IL-10 atuem de modo a proteger as células H-RS da apoptose deflagrada pelo tratamento quimioterápico, além da morte celular programada decorrente de mutações não-funcionais adquiridas e da perda do fenótipo típico de células B ^{62, 66}. Níveis séricos elevados de IL-10 foram relacionados a estadios mais avançados do LH, presença de sintomas constitucionais e menor sobrevida livre de progressão ^{62, 67}. São comumente detectados nos casos de LH associados à infecção pelo EBV ^{68, 69}. Em 2007, da Silva e colaboradores relataram que a presença de certos polimorfismos de nucleotídeos simples (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) na região promotora do gene da IL-10 está relacionada a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de LH associado à infecção pelo EBV ⁷⁰.

As principais funções descritas para IL-13 são regular a proliferação e sobrevivência de linfócitos B e controlar a mudança de classe de imunoglobulinas. Adicionalmente, essa citocina modifica as propriedades

imunomodulatórias de células monocíticas/macrofágicas. Embora não se atribua à IL-13 participação direta na diferenciação de células de perfil Th2, ela atua estimulando outras células a produzirem quimiocinas que recrutam células indutoras de resposta imunitária humoral⁶³. Um possível papel da IL-13 como fator autócrino de crescimento de células H-RS foi originalmente demonstrado *in vitro*^{63, 71}. Posteriormente, estudos *in vivo* revelaram elevada expressão de IL-13 citoplasmática em células de H-RS provenientes de LH, especialmente nos subtipos LH-EN e LH-CM. A expressão de receptores para a IL13 (IL-13R) foi observada em células H-RS, linfócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, fato que subsidia a hipótese de uma possível participação da citocina como fator de crescimento autócrino para a célula neoplásica e indutora de fibrose, particularmente no LH-EM^{72, 73}. Níveis séricos elevados de IL-13 foram detectados em pacientes recém-diagnosticados para LH quando comparados a indivíduos saudáveis, sugerindo relevância clínica da IL-13 na doença⁷⁴.

Acerca das citocinas com atividade na resposta imunitária celular (Perfil Th1), foi observada produção variável de IL-2 e INF- γ em linhagens derivadas de LH e tumores primários⁵⁷. Em estudo recente (2008), Cozen e colaboradores mostraram níveis diminuídos de IL-12 em indivíduos jovens com LH, sugerindo sua possível participação na etiopatogenia da doença nesse grupo de pacientes⁷⁵.

Ainda são escassos os estudos sobre as possíveis associações entre níveis séricos de citocinas e a apresentação do LH, sua evolução clínica, fatores prognósticos conhecidos e/ou características

histopatológicas dos tumores^{60-62, 76, 77}. As informações sobre os níveis séricos de citocinas após o tratamento do LH e seu potencial impacto na sobrevida do paciente são igualmente insuficientes⁶⁵. Os dados atualmente disponíveis sugerem que algumas citocinas, de fato, têm papel na história natural do LH. Entretanto, não foi demonstrada a eventual contribuição do monitoramento de seus níveis séricos durante a evolução da doença, bem como sua potencial aplicabilidade clínica.

Caracteristicamente o LH exibe disfunção do sistema imunológico, com deficiência sistêmica da resposta imunitária celular. Tendo em vista que algumas citocinas têm se revelado importantes na fisiopatogenia da doença, a determinação dos níveis séricos de algumas dessas moléculas ao diagnóstico e após o tratamento do LH pode fornecer informações significativas sobre o comportamento biológico da doença e sua evolução. Cotejado com dados clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos, esse parâmetro pode vir a ser fator prognóstico *per se*, permitindo a individualização do tratamento de pacientes com LH clássico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Med Chir Trans* 1832;17: 69-114.
 2. Wilks, S. Enlargement of the lymphatic glands and spleen (or, Hodgkin's disease), with remarks. *Guy's Hosp Rep* 1865;11:56-7.
 3. Sternberg C. Über einer eigenartige unter dem Blide der Pseudoleukamie velufende Tuberculose dès lymphathischem Apparates. *Ztschr Heilk* 1898;19:21-90.
 4. Reed D. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with special reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep* 1902;10:133-96.
 5. Papadaki T, Stamatopoulos K. Hodgkin disease immunopathogenesis: long standing questions, recent answers, further directions. *Immunology* 2003;117:508-11.
 6. Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J, Diehl V. Part 1: Hodgkin's lymphoma – molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet* 2004 5:11-18.
 7. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon 2001.
-

-
8. Re D, Kuppers R, Diehl V. Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23: 6379-86.
 9. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, Laumen H, Korbjuhn P, Anagnostopoulos I et al. Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* 2000; 95:1443-50
 10. Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res.* 2002;84:277-312.
 11. Weiss LM, Warnke RA, Hansmann ML, Chan JKC, Mueller-Hermelink HK, Harris NL et al. Pathology of Hodgkin Lymphoma. In: Hoppe RT, Mauch PT, Armitage JO, Diehl V, Weiss LM, editors. *Hodgkin Lymphoma*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.p. 43-71.
 12. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabbatini E, Zinzane PL, Piccaluga PP et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol* 2002;55:162-176.
 13. Schwering I, Brauninger A, Klein U, Jungnickel B, Tinguely M, Diehl V et al. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;101:1505-12.
-

-
14. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) SEER Stat Database. National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2006, based on the November 2005 SEER data submission.
 15. Thomas RK, Re D, Zander T, Wolf J, Diehl V. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002;13:147-52.
 16. Macmahon B. Epidemiology of Hodgkin's Disease. *Cancer Res* 1966;26:1189-200.
 17. NL Harris, ES Jaffe, H Stein, Banks PM, Chan JK, Cleary ML et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84:1361-92.
 18. Diehl V, Sextro M, Franklin, Hansmann ML, Harris N, Jaffe E et al. Clinical Presentation, Course, and Prognostic Factors in Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease and Lymphocyte-Rich Classical Hodgkin's Disease: Report From the European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol* 1999;17:776-83.
 19. Re D, Thomas RK, Behringer K, Diehl V. From Hodgkin's Disease to Hodgkin Lymphoma: Biological Insights and Therapeutic Potential. *Blood* 2005;105:4553-60.
-

20. S Bodis, MD Kraus, G Pinkus, Silver B, Canellos GPS, Schulman LN et al. Clinical presentation and outcome in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *J Clin Oncol.* 1997;15:3060-66.
21. Aster JC. Lymphocyte-Predominant Hodgkin's Disease: How Little Therapy Is Enough? *J Clin Oncol* 1999;17:744-6.
22. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000;343:481-92.
23. Dolcetti R, Boiocchi M. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Biomed & Pharmacother* 1998;52:13-25.
24. Kuppers R, Schmitz R, Distler V, Renné C, Bräuninguer A, Hansmann ML. Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2005;75(Suppl. 66):26-33.
25. Herling M, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, Kliche KO, Nadali G et al. Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Classical Hodgkin's Lymphoma: associations with presenting features, serum interleukin 10 levels, and clinical outcome. *Clinical Cancer Research* 2003;9:2114-20.
26. Ambinder RF. Epstein-Barr Virus and Hodgkin Lymphoma. *Hematology* 2007:204-9.
27. Williams H, Crawford DH. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood* 2006;107:862-9.
-

-
28. Dirmeier U, Hoffmann R, Kilger E, Schultheiss U, Briseño C, Gires O et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* 2005;24:1711-7.
29. Herbst H, Foss HD, Samol J, Araujo I, Klotzbach H, Krause H et al. Frequent Expression of Interleukin-10 by Epstein-Barr Virus-Harboring Tumor Cells of Hodgkin's Disease. *Blood* 1996;87:2918-29.
30. Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein-Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Pathol* 2007;60:1342-9.
31. Stain RS, Morgan DS. Hodgkin Disease. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, editors. *Wintrobe's Clinical Hematology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2004 p. 2521-54.
32. Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma – diagnosis and treatment. *Lancet* 2004;5:19-26.
33. Hodgson DC, Gospodarowicz MK. Clinical Evaluation and Staging of Hodgkin Lymphoma. In: Hoppe RT, Mauch PT, Armitage JO, Diehl V, Weiss LM, editors. *Hodgkin Lymphoma*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.p. 123-32.
34. Naumann R, Beuthien-Baumann B, Reiss A, Schulze J, Hänel A, Bredow J, et al. Substantial impact of FDG PET imaging on the therapy decision in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 2004;90:620-5.
-

-
35. Kwee TC, Kwee RM, Nievelstein RAJ. Imaging in staging of malignant lymphomas: a systematic review. *Blood* 2008;111:504-16.
 36. Schaefer NG, Taverna C, Strobel K, Wastl C, Kurrer M, Hany TF. Hodgkin disease: diagnostic value of FDG PET/CT after first-line therapy – is biopsy of FDG-avid lesions still needed? *Radiology* 2007;244:257-62.
 37. Connors, JM. Evolving Approaches to Primary Treatment of Hodgkin Lymphoma. *Hematology* 2005; 239-51.
 38. Straus DJ. Treatment of early-stage nonbulky Hodgkin lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2006;18:432-6.
 39. Diehl V. Chemotherapy or Combined Modality Treatment: the optimal treatment for Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol* 2004;22:15-8.
 40. Laskar S, Gupta T, Vimal S, Muckaden MA, Siakia TK, Pai SK et al. Consolidation Radiation After Complete Remission in Hodgkin's Disease Following Six Cycles of Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine Chemotherapy: Is There a Need? *J Clin Oncol* 2004;22:62-8.
 41. Lazarus HM, Rowlings PA, Zhang MJ, Vose JM, Armitage JO, Bierman PJ et al. Autotransplants for Hodgkin's Disease in Patients Never Achieving Remission: A Report From the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 1999;17:534.
-

-
42. Barlett, NL. Therapies for Relapsed Hodgkin Lymphoma: Transplant and Non -Transplant Approaches Including Immunotherapy. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*; 245-51.
43. Brice P. Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:3-13.
44. Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S, De Lena M, Uslenghi C. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer* 1975;36:252-9.
45. Sureda A. Autologous and Allogeneic Stem Cell Transplantation in Hodgkin's Lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2007;21:943-60.
46. Diehl V, Behringer K. Could BEACOPP be the new standard for the treatment of advanced Hodgkin's lymphoma ? *Cancer Investigation* 2006;24:461-5.
47. Meyer RM, Ambinder RF, Stroobants S. Hodgkin's Lymphoma: evolving concepts with implications for practice. *Hematology* 2004;184-201.
48. Connors JM. Hodgkin's Lymphoma: The Hazards of Success. *J Clin Oncol* 2003;21:3388-90.
49. Aisenberg AC. Problems in Hodgkin's Disease Management. *Blood* 1999;93:761-79.
-

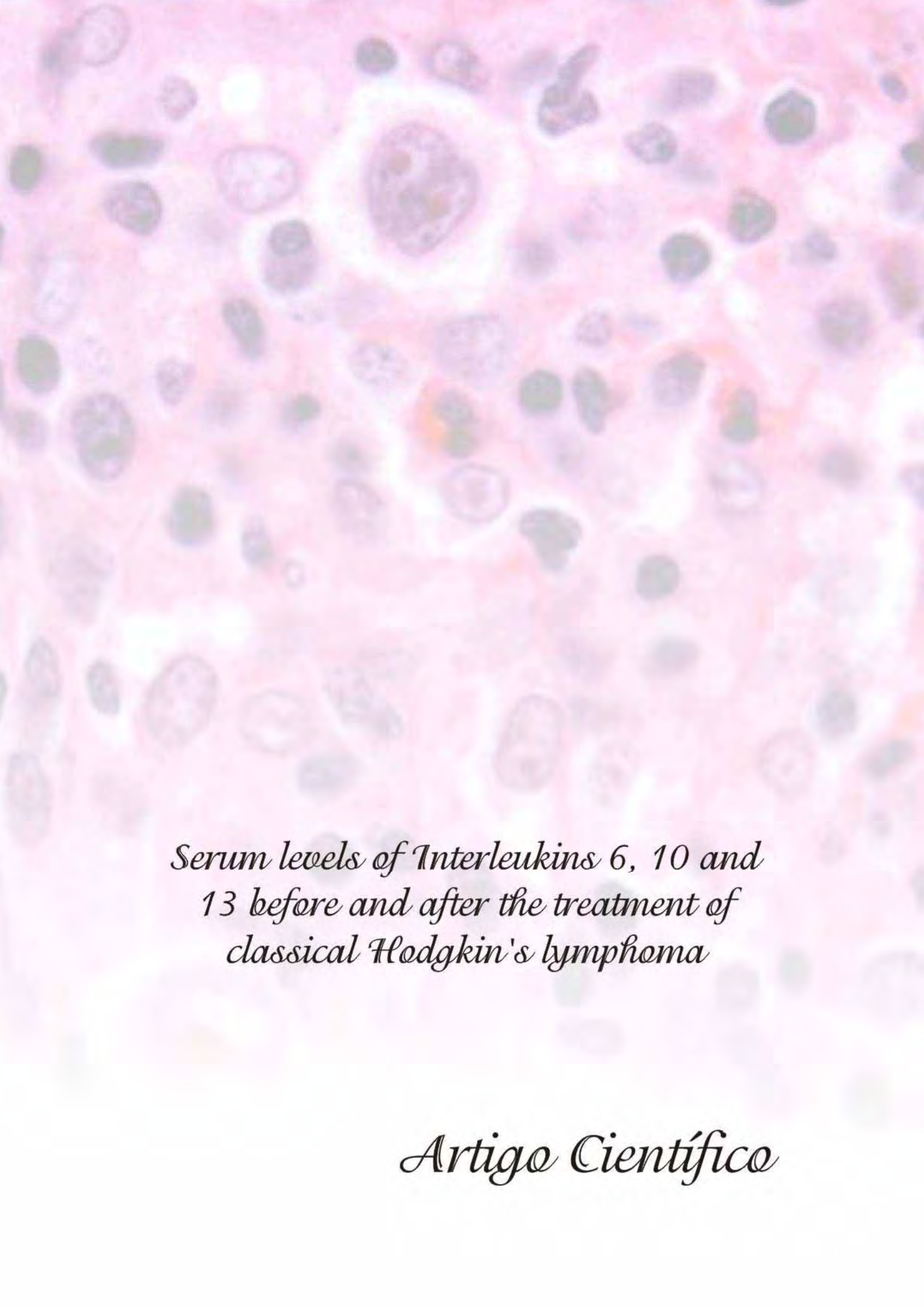
-
50. Diehl V, Stein H, Hummel M, Zollinger R, Connors JM. Hodgkin's Lymphoma: Biology and Treatment Strategies for Primary, Refractory and Relapsed Disease. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003;225-472.
51. Klimm B, Diehl V, Pfistner B, Engert A. Current treatment strategies of the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Eur J Haematol* 2005;75:125-34.
52. Hasenclever D, Diehl V. A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 1998; 339:1506-14.
53. Horning SJ. Risk, Cure and Complications in Advanced Hodgkin Disease. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2007:197-203.
54. Poppema S. Immunobiology and Pathophysiology of Hodgkin Lymphomas. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2005;231-8.
55. Gruss HJ, Pinto A, Duyster J, Poppema S, Herrmann F. Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways. *Immunology Today* 1997;18:156-63.
56. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103:1755-62.
57. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002;99:4283-97.
-

58. Abbas AK, Lichtman AH. In: Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 251-82..
59. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: A cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Experimental Hematology* 2006;34:399-406.
60. Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn MG et al. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103:3216-21.
61. Reynolds GM, Billingham LJ, Gray LJ, Flavell JR, Najafipour S, Crocker J et al. Interleukin 6 expression by Hodgkin/Reed-Sternberg cells is associated with the presence of 'B' symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 2002;118:195-201.
62. Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Kontopidou FN et al. Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2001;86:274-81.
63. Skinnider BF, Kapp U, Mak TW. The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1203-10.
-

64. Kurzrock R, Redman J, Cabanillas F, Jones D, Rothberg J, Talpaz M. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. *Can Res* 1993;53:2118-22.
65. Seymour JF, Talpaz M, Hagemeister FB, Cabanillas F, Kurzrock R. Clinical Correlates of Elevated Levels of Interleukin-6 in Patients with Untreated Hodgkin's Disease. *Am J Med* 1997;102:21-8.
66. Sarris AH, Kliche KO, Pethambaram P, Preti A, Tucker S, Jackow C et al. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann Oncol* 1999;10:433-40.
67. Herling M, Rassidakis GZ, Medeiros JL, Vassilakopoulos TP, Kliche KO, Nadali G et al. Expression of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Lymphoma: Associations with Presenting Features, Serum Interleukin 10 Levels, and Clinical Outcome. *Clin Can Res* 2003;9:2114-20.
68. Herbst H, Foss HD, Samol J, Araujo I, Klotzbach H, Krause H et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr Virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1996;87:2918-29.
-

69. Duckers DF, Jaspars LH, Voss W, Oudejans JJ, Hayes D, Cillessen S et al. Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles in Epstein-Barr virus-positive and negative cases of Hodgkin's disease. *J Pathol* 2000;190:143-9.
70. Da Silva GN, Bacchi MM, Rainho CA, de Oliveira DE. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1691-6.
71. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Käji D, Ho A et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 1999;189:1939-46.
72. Oshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M et al. Interleukin-13 and Interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology* 2001;38:368-75.
73. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trümper LH, von Bonin F, Kapp U et al. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;97:250-5.
74. Fiumara P, Cabanillas F, Younes A. Interleukin-13 levels in serum from patients with Hodgkin disease and healthy volunteers. *Blood* 2001;98:2877-8.
-

75. Cozen W, Gill OS, Salam MT, Nieters A, Masood R, Cockburn MG et al. Interleukin-2, interleukin-12, and interferon- levels and risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008;111:3377-82.
76. Fischer M, Bijman M, Molin D, Cormont F, Uyttenhove C, van Snick J et al. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2003;17(12):2513-6.
77. Mainow-Fouler T, Proctor SJ, Taylor PR. Interleukin 4 production by peripheral blood lymphocytes in patients with classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Res* 2004;28:159-66.
-



*Serum levels of Interleukins 6, 10 and
13 before and after the treatment of
classical Hodgkin's lymphoma*

Artigo Científico

**Serum levels of Interleukins 6, 10 and 13 before and after
the treatment of classical Hodgkin's lymphoma**

Authors:

Rafael Dezen Gaiolla, MD

Lígia Niéro-Melo, MD, PhD

Maria Aparecida Custódio Domingues, MD, PhD

Deilson Elgui de Oliveira, PhD

Institutions:

All authors from Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP)

- Botucatu, SP, Brazil

Mail Address

Rafael Dezen Gaiolla, MD

Botucatu School of Medicine – UNESP

Pathology Department - Molecular Pathology Laboratory

Rubião Junior, s/n - CEP 18618-970,

Botucatu, Sao Paulo, Brazil

Phone/Fax: +55 14 3811-6038

E-mail: rgaiolla@fmb.unesp.br

Resumo

O Linfoma de Hodgkin (LH) é uma neoplasia linfóide histologicamente caracterizada pela presença de escassas células neoplásicas peculiares, denominadas células de Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS), em meio a infiltrado inflamatório não-neoplásico. Seu curso clínico está diretamente relacionado ao estadiamento, subtipo histológico e presença de alguns fatores prognósticos adversos já estabelecidos. Sintomas constitucionais como febre, perda de peso e sudoreses noturna, associados a um aparente desbalanço da resposta imune celular, são características comuns ao diagnóstico e denotam anormalidade da resposta imunológica desses pacientes, provavelmente causada pela produção de diferentes citocinas, tanto pelas células H-RS como pelo infiltrado inflamatório de permeio. Na maior parte dos casos de LH, há produção aumentada de citocinas de padrão Th2. No presente estudo, foram determinadas, por ELISA, as concentrações séricas de IL-6, IL-10 e IL-13 de 28 pacientes com LH clássico, antes e depois do tratamento anti-neoplásico, e de 26 voluntários saudáveis que compuseram grupo-controle. Dosagens de IL-6 e IL-10 pré-tratamento foram significativamente maiores nos pacientes em relação ao grupo-controle. Todos os pacientes apresentaram redução do nível sérico de IL-6 e IL-10 após o tratamento antineoplásico. Ao diagnóstico, níveis elevados de IL-6 foram associados à presença de linfonomegalia abdominal, hepatomegalia, sintomas B e anemia. O estudo da regressão linear múltipla mostrou que sintomas B e linfocitopenia são bons preditores de níveis séricos pré-tratamento de IL-6. Níveis elevados de IL-10 foram relacionados à hipoalbuminemia e hepatomegalia. Nenhum paciente apresentou dosagem

sérica detectável de IL-13. Os resultados demonstram que níveis séricos elevados de IL-6 e IL-10 ao diagnóstico estão relacionados à presença de alguns fatores prognósticos adversos do LH, sendo que uma menor redução dos níveis séricos de IL-6 após o tratamento anti-neoplásico pode estar relacionada a maior risco de falha terapêutica.

Abstract

Background and objectives. Hodgkin's lymphoma (HL) is a malignant lymphoid neoplasia characterized by abnormal immune response. Part of this disturbance is attributable to the activity of cytokines produced by the malignant Hodgkin/Reed-Sternbergh cells and reactive inflammatory cells. IL-6, IL-10 and IL-13 seem to play an important role in the pathogenesis of HL. Although some features of the disease have been associated with the production of these interleukins, there is insufficient data about changes in its serum levels at diagnosis and after the treatment, as well as its potencial use as biomarkers of HL course. **Design and Methods.** Serum levels pre and post treatment of IL-6, IL-10 and IL-13 in 28 patients with HL were determined by ELISA. Results were evaluated against clinical and laboratory parameters, as well as response to treatment and presence of infection by the Epstein-Barr virus (EBV), assessed by in situ hybridization with biotinylated probe directed to the viral transcript EBER-1. Serum samples from 26 healthy blood-donors volunteers were evaluated as a control group. **Results.** IL-6 and IL-10 serum levels before treatment of HL were significantly higher in patients compared to healthy individuals ($p < 0,001$), and a significant reduction after treatment of the disease was observed ($p < 0,001$). Serum levels of IL-13 were indetectable both in patients (before and after treatment) and controls. Serum levels of IL-6 before treatment were higher in patients with abdominal involvement by HL ($p = 0,03$), hepatomegaly ($p = 0,04$), B-symptoms ($p = 0,01$), and anemia ($p = 0,02$). On the other hand, IL-10 pre-treatment levels were higher in patients with hypoalbuminemia ($p = 0,04$) and hepatomegaly ($p = 0,01$). Multivariate analysis

revealed that lymphocytopenia and B-symptoms were good predictors of IL-6 levels in serum before treatment of patients with HL. Interpretation and **Conclusions.** Pre-treatment levels of IL-6 and IL-10 in serum are frequently elevated in patients with HL and decrease substantially after treatment. In addition, this elevated levels are associated with some clinical and laboratory features of the disease. The potential association verified between post-treatment levels of IL-6 and treatment failure remains to be confirmed in a larger group of patients.

Key words: Hodgkin's lymphoma, Epstein-Barr virus, cytokines, immunobiology, ELISA.

1. Introduction

Although multiagent chemotherapy is effective for treatment of Hodgkin's lymphomas (HL), with a high proportion of cure, in some cases, particularly patients presenting with advanced disease, the tumor may progress during treatment or relapse after achieving complete remission¹⁻⁶. Therefore, identification of patients with HL that would benefit from more or less aggressive therapeutic approaches is of pivotal importance. In this regard, several investigators have attempted to identify clinical and laboratory markers to predict unfavorable outcome. Prognostic models described so far are useful in identifying patients with poor response to standard therapy. However, none of them has been enough to stratify patients properly to allow changes in the standard treatment^{7, 8, 9, 10}. In addition, most of the proposed models do not take into consideration many important biologic features of HL, notably changes in the immune system during disease.

Classical Hodgkin's lymphoma (cHL) is characterized by a low frequency of malignant cells, denominated Hodgkin or Reed-Sternberg (H-RS) cells, which are dispersed within an usually abundant reactive cellular infiltrate, composed by lymphocytes, eosinophils, fibroblasts, macrophages and plasma cells. Constitutional symptoms such as fever, weight loss and night sweats are common at presentation reflect an abnormal function of the immune system, and it is known that patients have a defect in cell-mediated immune response. These are thought to be caused by the activity of cytokines, produced by the H-RS cells and the reactive inflammatory cells^{11, 12, 13}. At this point, cytokines are

known to play an important role in the pathogenesis of cHL^{11, 14}, and high levels of some interleukins have been correlated with disease activity and prognosis. Noteworthy, the majority of cHL cases are characterized by an unbalanced production of Th2 cytokines^{13, 15-23}.

Considering the available data on cytokines commonly detected in HL, interleukins 6 (IL-6), 10 (IL-10) and 13 (IL-13) deserve special attention. IL-6 is an important immunomodulatory cytokine that can induce growth and maturation of B and T cells^{24, 25}, and acts as growth factor for B cells, including EBV-transformed ones²⁶. It was shown that both HL-derived cell lines and primary H-RS cells express IL-6 and its receptor^{27, 28}. Elevated levels of IL-6 in serum of HL patients have been associated with poor prognosis due to lower rates of complete remission^{17, 21}. IL-10, on the other hand, is a cytokine with strong antiinflammatory properties¹¹. It also supports growth and differentiation of B-cells, and it may inhibit apoptosis of B and T-cells induced by glucocorticoids and chemotherapy²⁹. In HL, IL-10 and its receptor have been detected in H-RS, especially when latently-infected by EBV^{23, 30}. Serum IL-10 levels are frequently elevated in HL patients and have been associated with lower failure-free survival^{17, 31, 32}. Finally, IL-13 is a cytokine that regulates humoral response by driving the proliferation and survival of B-cells and triggering immunoglobulin class switching. IL-13 and its receptor also have been shown to be expressed by HL-derived and primary H-RS cells¹¹. In fact, some authors suggested that IL-13 acts as an autocrine growth factor for the neoplastic cells in HL^{18, 33, 34, 35}.

Although the current literature suggest an important role of IL-6, IL-10 and IL-13 in the pathogenesis of cHL, only few studies have analyzed these cytokines in the light of clinical and prognostic aspects of the disease¹⁸⁻²². In addition, there is insufficient data about these cytokines before and after anti-neoplastic treatment²⁰. Moreover, the aim of the present study was to evaluate IL-6, IL-10 and IL-13 serum levels before and after the current standard treatment of cHL, as well as to investigate the possible associations with clinicopathological parameters and treatment response.

2. Design and Methods

2.1. Patients

Patients selected for this study were all HIV-negative, had diagnosis of cHL confirmed by histopathology and immunophenotyping, and were not subjected previously to cytotoxic or radiation treatment. Patients were treated between 2005 and 2008 at Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP Botucatu, SP), and Amaral Carvalho Hospital (Jaú, SP), both in Sao Paulo State, Brazil. Serum samples were collected at the initial medical visit upon diagnosis of HL as well as one month after the end of chemotherapy. Additionally, serum samples of 26 healthy blood-donnors volunteers were collected to compose the control group. All samples were stored at -86°C until use. The present study was approved by the Ethical Comitee on Research of both institutions where subjects came from, and informed consent was obtained from all participants, in accordance with institutional guidelines.

2.2. Disease staging and laboratory evaluation

All patients were clinically staged according to the Ann-Arbor system³⁶. Each of them underwent a complete medical history interview and physical examination, blood cell counts, biochemical profile, computed tomography of the chest, abdomen and pelvis, as well as bone marrow

aspiration and biopsy. The presence of B symptoms was defined by one or more of the following symptoms: unexplained fever of 38°C and higher, drenching night sweats or unexplained weight loss of more than 10% of body weight in the preceding 6 months. Bulky disease was defined as the presence of nodal mass greater than 10cm in diameter. Hemoglobin, white blood cell counts, serum albumin, erythrocyte sedimentation rate (ESR) and serum lactate dehydrogenase (LDH) were measured by standard assays set up at each participant institution. Anemia was defined as the presence of hemoglobin levels less than 12 g/dL. In both institutions, the lower limit of albumin was 3,5 g/dL. Serum β -2 microglobulin was measured by radioimmunoassay and its upper normal limit was 3,5mg/dL.

2.3. Immunohistochemistry and EBV status

Immunohistochemical stainings were performed in sections of paraffin-embedded tumor biopsies. Histological sections were stained with anti-CD43 (DF-T1 clone, 1:150), anti-CD45 (2B11 + PD7/26 clone, 1:200), anti-CD20 (L26 clone, 1:200), anti-CD30 (Ber-H2 clone, 1:40), anti-CD15 (C3D-1 clone, 1:150) and polyclonal anti-CD3 (1:150), all from *Dako Cytomation* (Carpinteria, CA, USA). *In situ* hybridization (ISH) for assessment of EBV infection by the expression of the EBV-encoded RNA 1 (EBER-1) was performed as described elsewhere³⁷. EBV-positive Burkitt lymphoma biopsies were used as positive controls for EBV evaluation by EBER-1 ISH.

2.4. Determination of interleukin serum levels

Levels of IL-6, IL-10 and IL-13 were determined for controls and patients in serum samples. Samples were stored frozen in small aliquots (500 μ L) and thawed only once. Quantification of cytokines was performed by the following commercially-available sandwich enzyme-linked immunoassays, accordingly to manufacturer instructions: human IL-13 Quantikine™ (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), human IL-6 ELISA MAX™ and human IL-10 ELISA MAX™ (Biolegend, Inc., San Diego, CA, USA). Each serum sample was assayed in duplicate and cytokine levels were determined in the Bio-Rad microplate reader model 680 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) set at wavelength 450nm, with (IL-13) or without (IL-6 and IL-10) corrections at 570nm. According to information provided by the manufacturer of the ELISA kits used, the lower limit of interleukin detection for IL-6, IL-10 and IL-13 were 4 pg/mL, 2 pg/mL and 32 pg/mL, respectively.

2.5. HL treatment

Treatment of HL patients was based on the ABVD or BEACOPP regimens. Involved field radiation therapy (RT) was considered as consolidation treatment for patients in early and intermediate stages, or for those presenting with bulky disease. Complete remission (CR) was defined as absence of disease for at least one month, as assessed by physical examination and appropriate laboratory and imaging studies. Partial remission (PR) was defined as more than 50% reduction of tumor mass measurable in two dimensions.

Progressive disease (PD) was defined as enlargement (higher than 25%) of a preexisting site of disease, or development of disease in a previously uninvolved site. Primary treatment failure was defined as PD during initial treatment, as well as failure to achieve CR or PR after initial therapy, or PD within five months after CR.

2.6. Statistical analysis

Data were presented as medians, lower and upper quartiles. Categorical variables were compared by the chi-square test and continuous variables by the Mann-Whitney test or the one-way ANOVA test. Wilcoxon test was used to compare serum levels of both IL-6 and IL-10 pre and post-treatment. Spearman's test was conducted to study correlations between serum levels of the studied interleukins and the storage time of samples, to investigate any detrimental effect on the detected levels of cytokines by ELISA.

Clinical and laboratorial data were used in two models of multiple linear regressions for prediction of serum levels of IL-6 and IL-10. Before performing the statistical tests, values of interleukins levels were transformed to their neperian logarithms, in order to normalize their distribution. Collinearity among variables was tested using the chi-square test. The models were checked for linearity, independence and normality.

All statistical calculations were performed using the SigmaStat 3.5 Software (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). All p values were considered significant when smaller than 0,05.

3. Results

Serum levels of IL-6 in the blood donors (control group) ranged from less than 4 pg/mL to 20,2 pg/mL (median of less than 4 pg/mL), and serum levels of IL-10 from less than 2 pg/mL to 50,1 pg/mL (median less than 2 pg/mL). Serum levels of IL-13 were always below the limit of detection of the assay (less than 32 pg/mL). Eighteen out of 26 controls (69%) had IL-6 serum levels below the limit of detection of the assay (less than 4pg/mL), while 19 controls (73%) had serum levels below the limit of detection of the assay for IL-10 (less than 2 pg/mL).

Twenty-eight patients with HL were studied. The distribution of age and sex was similar among the HL patients and healthy controls. The median value of serum levels of IL-6 at diagnosis was 22,5 pg/mL (ranged less than 4 - 434,2 pg/mL). Only 4 (14,3%) patients had serum IL-6 levels below the detection limit of the assay. The serum levels of IL-6 were significantly higher in HL patients before treatment than in the controls ($p < 0,001$). In the case of IL-10, the median value of pre-treatment serum levels was 14,8 pg/mL (ranged less than 2 - 250 pg/mL), and only 4 (14,3%) patients had serum levels below de limit of detection of the assay. As observed for IL-6, the levels of IL-10 in serum were significantly higher in HL patients before treatment compared to controls ($p < 0,001$).

After treatment, the median of IL-6 serum levels were less than 4 pg/mL in HL patients, a significant reduction when compared with their pre-

treatment levels ($p < 0,001$). The same was observed for IL-10 (median of less than 2 pg/mL after treatment; $p < 0,001$). Before and after treatment, all HL patients had IL-13 serum levels below the limit of detection of the assay. The median time of sample storage before analysis by ELISA was 18,6 months for IL-6 (range 4,4 – 40,7 months), 18,8 months for IL-10 (range 13,3 – 30,5 months) and 18,6 months for IL-13 (range 13,2 – 30,3 months). The storage time had no influence in the interleukins levels detected (for IL-6 and IL-10, $R = -0,14 / p = 0,47$ and $R = -0,14 / p = 0,46$, respectively).

3.1 Association of serum interleukins and disease features

When analyzed as continuous variables, serum levels of IL-6 before treatment were higher in patients with abdominal involvement by HL, hepatomegaly, B-symptoms and anemia (Figure 1). IL-6 serum levels were also compared with age, gender, Ann-Arbor stage, mediastinum involvement, splenomegaly, extranodal disease, bone marrow involvement, bulky disease, leucocytosis, albumin serum levels, LDH, serum β -2 microglobulin, EBER-1, HL histological subtype, CD-20 positivity, response to treatment and treatment failure, but no association was observed. However, there was a trend between higher serum levels of IL-6 after treatment and treatment failure ($p = 0,08$).

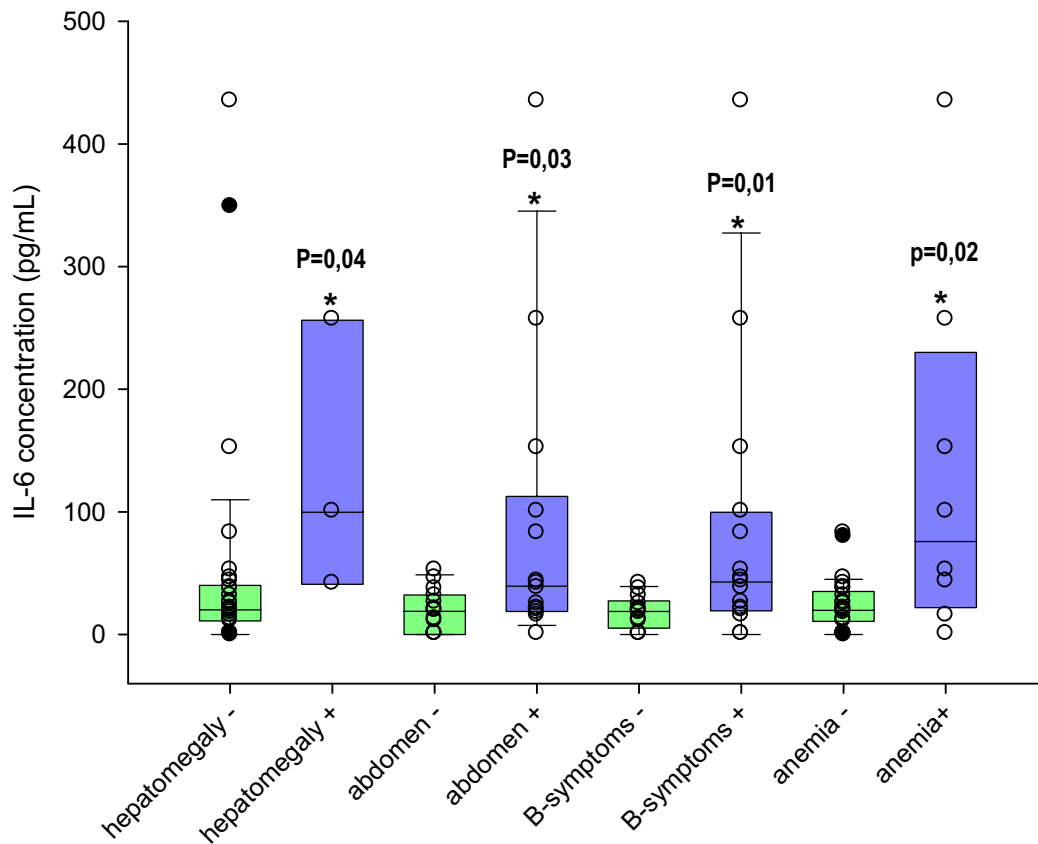


Figure 1 – Association between pre-treatment IL-6 serum levels and clinical features of 28 patients with Hodgkin's lymphoma. Bars represent medians (low quartile, upper quartile) and circles represent individual values of serum IL-6.

In respect to IL-10, serum levels were higher in patients with low serum albumin. There was also a trend considering higher IL-10 levels and advanced Ann-Arbor stage, abdominal involvement, hepatomegaly, B-symptoms and anemia (Figure 2). There was no association between IL-10 levels and the remaining variables previously mentioned.

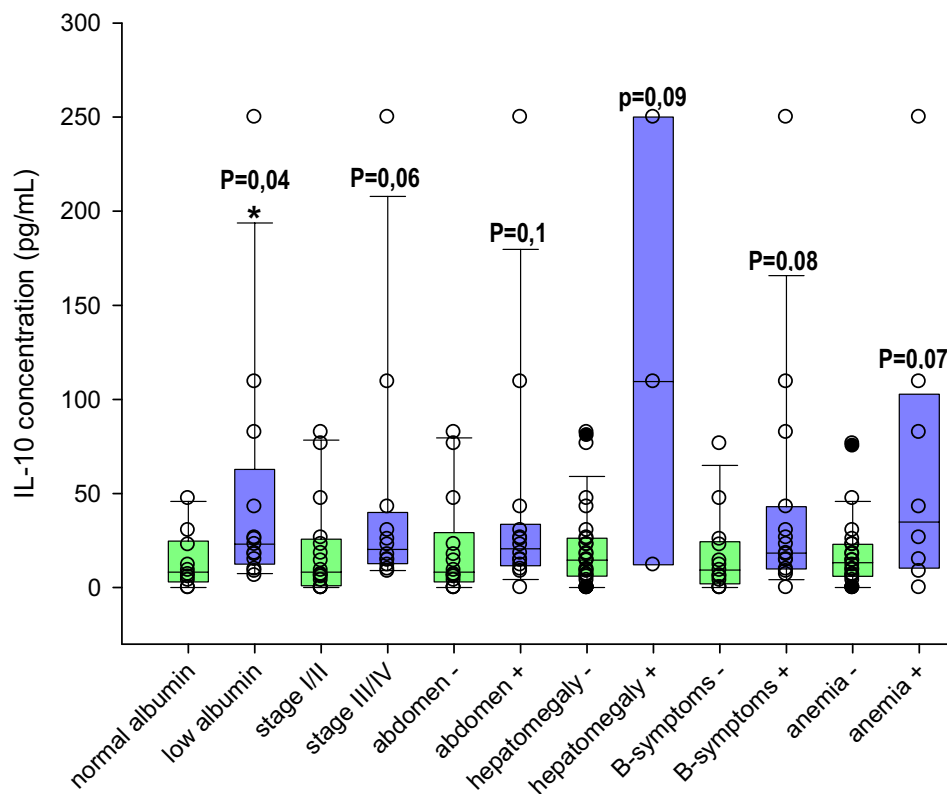


Figure 2 – Association between pre-treatment IL-10 serum levels and clinical and laboratory features of 28 patients with Hodgkin's lymphoma. The bars represent medians (low quartile, upper quartile) and the circles represent individual values of serum IL-10.

Multiple linear regression was performed with Ann-Arbor stage, mediastinal involvement, B-symptoms, leucocytosis and lymphocytopenia, known to be clinical relevant in cHL. Gender and age were included independently of association with IL-6 or IL-10 levels because they are well-known prognostic variables for HL. Mediastinal involvement, splenomegaly, extranodal disease and anemia were excluded from the model due to collinearity. Serum β -2 microglobulin, LDH, serum albumin and EBER-1 were not included because informations on these parameters were missing for some patients.

B-symptoms and lymphocytopenia were identified as potent predictors of the serum levels of IL-6 before treatment. These results are shown in Table 1. Although hepatomegaly was associated with high IL-10 levels ($p=0,01$), none of the studied variables were able to predict the cytokine levels in serum.

Table 1 – Multiple linear regression analysis of predictors for IL-6 serum levels in 28 patients with Hodgkin lymphoma.

Dependent variable	Predictors	Coefficient	Standard error	<i>p</i>
IL-6 (pg/ml)	Gender	-0,452	0,425	0,3
	Age	-0,146	0,429	0,74
	B-symptoms	1,292	0,413	0,005
	Linfocytopenia	-2,056	0,821	0,02

4. Discussion

Classical HL is characterized by well-defined histological features, notably H-RS cells surrounded by a heterogeneous and abundant inflammatory infiltrate, which provides a propitious microenvironment for their proliferation and survival. A complex network of interactions mediated by cytokines, chemokines and cell-cell interactions does exist between different cell types in HL, and it seems crucial for the development and progression of the tumor^{38, 39}. Several aspects about different cytokines that contribute to the pathogenesis of HL have been studied, providing a better understanding of the immune dysfunction and symptomatology associated with this disease^{11, 12, 14}. However, the exact role of cytokines in the cause-effect relationship between H-RS cells and microenvironment remains obscure.

In the present study, serum levels of IL-6 and IL-10 were frequently elevated in cHL patients at diagnosis compared to normal volunteers, and they decreased substantially after treatment. On the other hand, IL-13 was always undetectable in serum by ELISA method used. It was observed that IL-6 and IL-10 serum levels were associated with some clinical and laboratory features of HL. Remarkable, in the HL patients evaluated the IL-6 levels in serum could be predicted by the presence of B-symptoms (high) and lymphocytopenia (low levels).

Besides its activity as an activator of acute phase response and a stimulatory factor for growth and proliferation of lymphocytes, important activities for IL-6 both in the innate immunity and the development of acquired

immune response have been documented^{40, 41}. IL-6 plays a central role in inflammation as a regulator of the transition between humoral and cellular responses, which could explain, at least in part, some features on the pathobiology of HL and its clinical manifestations.

Clinical and laboratory correlates of IL-6 levels in HL have been previously studied in both untreated and relapsed patients, with some discordant results^{16, 19, 20, 42}. In agreement with previously reported data, in the present study it was observed an association between higher IL-6 serum levels before treatment and presence of B-symptoms^{19, 20}. Additionally, patients with higher levels of IL-6 presented more often hepatomegaly, abdominal disease and anemia. On the other hand, no association with gender, Ann-Arbor stage and bulky disease were observed. A possible explanation for this might be the small number of patients studied in comparison to other series^{19, 20}.

IL-6 is known to have an important role in the pathophysiology of cancer-induced cachexia and this cytokine shows catabolic properties^{25, 43, 44}. Therefore, the presence of elevated levels of IL-6 may be associated with fever, night sweats and the weight loss observed in patients with HL, which are important for diagnosis of the disease and drive treatment choices. However, the predominant source of IL-6 in HL patients and its activity in the tumoral microenvironment remain elusive. It is reported that reactive cells surrounding H-RS cells, mainly T lymphocytes, may stimulate the growth of H-RS cells both by direct production of IL-6 or being stimulated by IL-6 to produce other stimulatory cytokines²⁷. Similar to B-symptoms, lymphocytopenia has been previously determined as an adverse prognostic factor associated with

advanced HL⁹. Interestingly, in the present study it predicted lower levels of IL-6. One possible explanation for this phenomenon is that the low lymphocyte count might reflect a histological change in HL towards a pattern with more proliferation of H-RS cells, rather than stimulation of reactive inflammatory cells. Taken together, these data suggest that a subset of HL may exhibit a more discrete inflammatory component along with a higher number of H-RS cells and worse evolution as consequence.

For IL-10, higher levels of this cytokine in serum before treatment of HL patients were related to low serum albumin and hepatomegaly. There was also a trend of association with advanced Ann-Arbor stages, abdominal involvement, B-symptoms and anemia, which are in agreement with previous studies^{17, 21}. However, the previously reported association between high IL-10 levels and EBV infection was not observed. Herling (2003) et al. reported that higher serum levels of IL-10 before treatment were associated with the immunostaining for EBV LMP-1, mainly in mixed cellularity subtype²². Unfortunately, in the present study the EBV status could not be retrieved for all patients, and the lack of association between IL-10 levels and EBV infection might be due to the limited number of EBV-positive HL patients in the present casuistic, or even a low number of MCHL cases.

For all subjects evaluated, serum levels of IL-13 were systematically undetectable. In a similar fashion, low frequency of detectable levels of this cytokine and no association with clinical features of HL was previously described⁴⁵. Interestingly, several studies have suggested a key role of IL-13 as an autocrine growth factor in HL. IL-13 mRNA is frequently

expressed in the tumors, almost exclusively by H-RS cells. The IL-13 receptor transcripts are expressed not only in H-RS cells, but also by a large proportion of other cells within the reactive infiltrate, including fibroblasts. This data suggests that IL-13 may also support the maintenance of the reactive infiltrate in HL. In addition, treatment of HL-derived cell line with a neutralizing antibody to IL-13 resulted in a dose-dependent inhibition of H-RS proliferation^{33 – 35}. The accumulating evidence indicates that co-expression of IL-13 and its receptor is a common feature of H-RS cells, strengthening the IL-13 activity as an autocrine growth factor in HL. The findings of undetectable serum levels of IL-13 do not refute this hypothesis, but it may suggest that IL-13 acts predominantly at the level of the tumor microenvironment, possibly in very low concentrations and with short range of action.

As far as it could be verified, the serum levels of IL-6 after HL treatment were evaluated in only one previous study²⁰, and there is no report on the levels of IL-10 after treatment. Seymour and coworkers (1997) reported that only 10/65 (15.4%) patients evaluated had detectable IL-6 serum levels after treatment, and they became significantly lower than levels measured before chemotherapy²⁰. In the present study, except for IL-13 (which were undetectable in all subjects), a significant decrease of IL-6 and IL-10 in serum after the antineoplastic treatment was observed, which demonstrate that the chemotherapy can effectively disrupt the microenvironment network of cytokine signaling. In addition, it was also observed a trend of association between higher serum levels of IL-6 after treatment and treatment failure, suggesting that IL-6 may be involved in mechanisms of tumor resistance. However, longer follow-up of a more significant number of HL patients evaluated would be

necessary to state conclusively whether the reduction of IL-6 with treatment is a clear-cut predictor of good response.

In summary, it was observed that pre-treatment serum levels of IL-6 and IL-10 were associated with some clinical and laboratory parameters in HL patients, and that these cytokines decrease significantly after treatment. Higher IL-6 serum levels after chemotherapy seem to be associated with treatment failure, but this data requires confirmation in large series.

Acknowledges

The authors would wish to thank Ms. Celene Maria Gandin, Mr. Marcos Roberto Franchi, and Mr. Luis Fernando Franchi for their technical assistance in histological and immunohistochemical techniques; Carlos Eduardo Bacchi, MD, PhD and Francisco Carlos Quevedo, MD, for providing us access to HL biopsies for analysis; Sergio Alberto Rupp de Paiva, MD, PhD, Marcos Ferreira Minicucci, MD and Suzana Erico Tani Minamoto, MD for their support with the statistical analysis; and Alice de Oliveira Gonçalves, BSc and the current staff of the Molecular Pathology Laboratory at Botucatu School of Medicine (UNESP) for their help with samples and experiments. This work was supported by FAPESP grant# 2006/00591-5.

Disclosures

Conflict of interest: none.

References

1. Straus DJ. Treatment of early-stage nonbulky Hodgkin lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2006;18:432-36.
 2. Diehl V. Chemotherapy or Combined Modality Treatment: the optimal treatment for Hodgkin's Disease. *J Clin Oncol* 2004;22:15-18.
 3. Laskar S, Gupta T, Vimal S, Muckaden MA, Siakia TK, Pai SK et al. Consolidation Radiation After Complete Remission in Hodgkin's Disease Following Six Cycles of Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine Chemotherapy: Is There a Need? *J Clin Oncol* 2004;22:62-68.
 4. Lazarus HM, Rowlings PA, Zhang MJ, Vose JM, Armitage JO, Bierman PJ et al. Autotransplants for Hodgkin's Disease in Patients Never Achieving Remission: A Report From the Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol* 1999;17:534.
 5. Barlett, NL. Therapies for Relapsed Hodgkin Lymphoma: Transplant and Non -Transplant Approaches Including Immunotherapy. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*; 245-51.
 6. Brice P. Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:3-13.
-

-
7. Diehl V, Stein H, Hummel M, Zollinger R, Connors JM. Hodgkin's Lymphoma: Biology and Treatment Strategies for Primary, Refractory and Relapsed Disease. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2003;225-472.
 8. Klimm B, Diehl V, Pfistner B, Engert A. Current treatment strategies of the German Hodgkin Study Group (GHSG). *Eur J Haematol* 2005;75:125-34.
 9. Hasenclever D, Diehl V. A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med* 1998; 339:1506-14.
 10. Diehl V, Thomas RK, Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma – diagnosis and treatment. *Lancet* 2004;5:19-26.
 11. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002;99:4283-97.
 12. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: A cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Experimental Hematology* 2006;34:399-406.
 13. Poppema S. Immunobiology and Pathophysiology of Hodgkin Lymphomas. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2005;231-38.
-

-
14. Gruss HJ, Pinto A, Duyster J, Poppema S, Herrmann F. Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways. *Immunology Today* 1997;18:156-63.
 15. Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn MG et al. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103:3216-21.
 16. Reynolds GM, Billingham LJ, Gray LJ, Flavell JR, Najafipour S, Crocker J et al. Interleukin 6 expression by Hodgkin/Reed-Sternberg cells is associated with the presence of 'B' symptoms and failure to achieve complete remission in patients with advanced Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* 2002;118:195-201.
 17. Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Kontopidou FN et al. Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2001;86:274-81.
 18. Skinnider BF, Kapp U, Mak TW. The role of interleukin 13 in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2002;43:1203-10.
 19. Kurzrock R, Redman J, Cabanillas F, Jones D, Rothberg J, Talpaz M. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. *Can Res* 1993;53:2118-22.
-

-
20. Seymour JF, Talpaz M, Hagemeister FB, Cabanillas F, Kurzrock R. Clinical Correlates of Elevated Levels of Interleukin-6 in Patients with Untreated Hodgkin's Disease. *Am J Med* 1997;102:21-28.
 21. Sarris AH, Kliche KO, Pethambaram P, Preti A, Tucker S, Jackow C et al. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann Oncol* 1999;10:433-40.
 22. Herling M, Rassidakis GZ, Medeiros JL, Vassilakopoulos TP, Kliche KO, Nadali G et al. Expression of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Lymphoma: Associations with Presenting Features, Serum Interleukin 10 Levels, and Clinical Outcome. *Clin Can Res* 2003;9:2114-20.
 23. Herbst H, Foss HD, Samol J, Araujo I, Klotzbach H, Krause H et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr Virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood* 1996;87:2918-29.
 24. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78
 25. Barton BE. The biological effects of interleukin 6. *Med Res Rev* 1996;16:87-109.
-

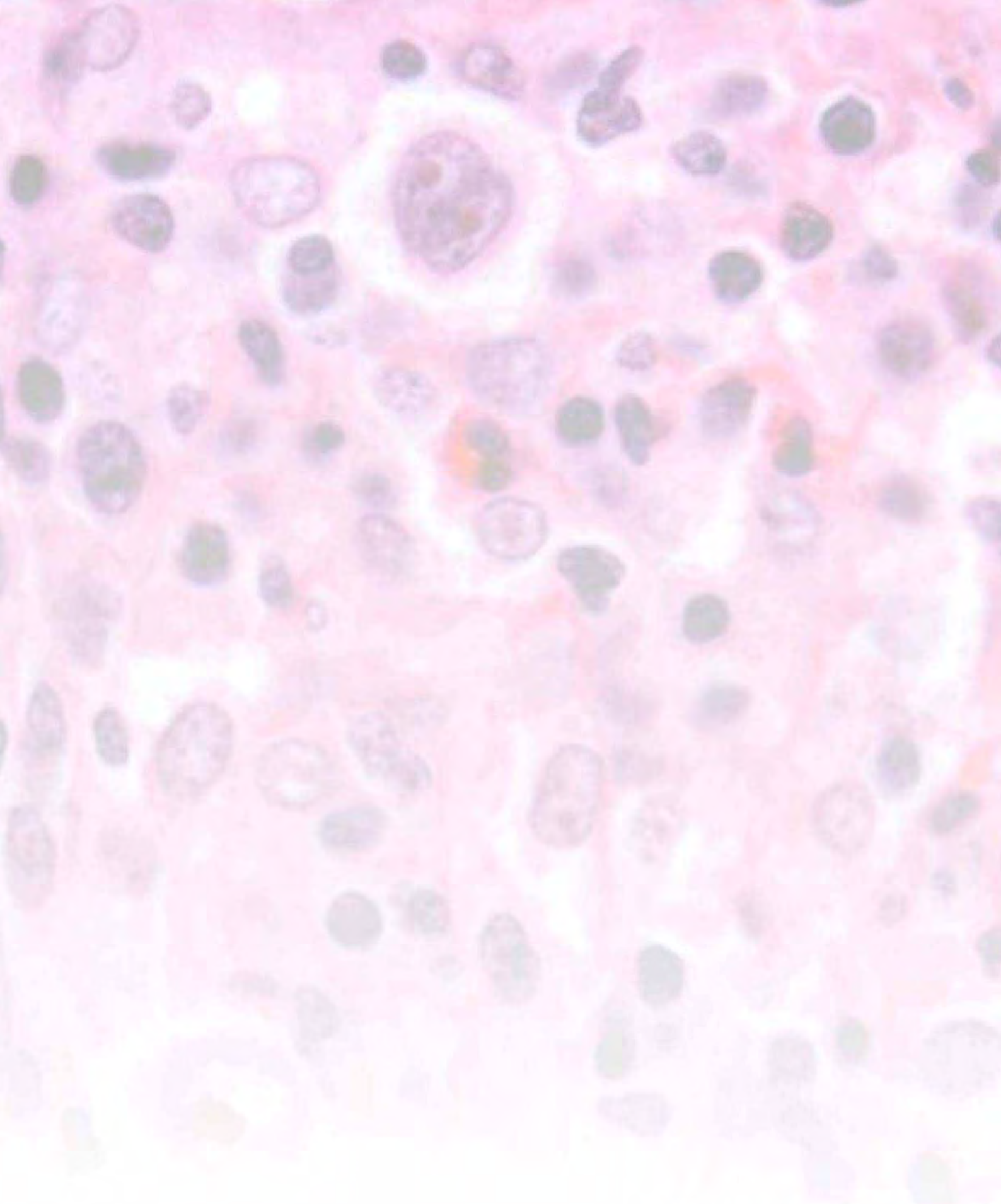
-
26. Herbst H, Samol J, Foss HD, Raff T, Niedobitek G. Modulation of interleukin-6 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells by Epstein-Barr virud. *J Pathol* 1997;182:299-306.
 27. Jucker, M, Abts H, Li W, Schindler R, Merzs H, Gunther A et al. Expression of Interleukin-6 and Interleukin-6 Receptor in Hodgkin's Disease. *Blood* 1991;11:2413-18.
 28. Foss HD, Herbst H, Oelman E, Samol J, Grebe M, Blankenstein T, et al. Lymphotoxin, tumor necrosis factro and interleukin-6 gene transcripts are presetrn in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin' disease cases. *Br J Haematol* 1993;84:627-35.
 29. Levy Y, Brouet JC. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J Clin Investig* 1994;93:424-28.
 30. Duckers DF, Jaspars LH, Voss W, Oudejans JJ, Hayes D, Cillessen S et al. Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles in Epstein-Barr virus-positive and negative cases of Hodgkin's disease. *J Pathol* 2000;190:143-49.
 31. Bohlen H, Kessler M, Sextro M, Diehl V, Tesch H. Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin' disease. *Ann Hematol* 2000;79:110-3.
-

-
32. Viviani S, Notti P, Bonfante V, Verderio P, Valagussa P, Bonddonna G. Elevated pretreatment serum of IL-10 are associated with poor prognosis in Hodgkin's disease, the Milan Cancer Institute experience. *Med Oncol* 2000;17:59-63.
 33. Kapp U, Yeh WC, Patterson B, Elia AJ, Käji D, Ho A et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 1999;189:1939-46.
 34. Oshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M et al. Interleukin-13 and Interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology* 2001;38:368-75.
 35. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Trümper LH, von Bonin F, Kapp U et al. Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001;97:250-55.
 36. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol* 1989;7:1630-36.
-

-
37. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006;126:284-93.
 38. Gruss HJ, Pinto A, Duyster J, Poppema S, Herrmann F. Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways. *Immunology Today* 1997;18:156-63.
 39. Enblad G, Molin D, Glimelius I, Fisher M, Nilsson G. The potential role of innate immunity in the pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 2007;21:805-23.
 40. Jones AS. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol* 2005;175:3463-68.
 41. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 2006;80:227-36.
 42. Gause A, Scholz R, Klein S, Jung W, Diehl V, Tesch H, Hasenclever D, Pfreundschuh M. Increased levels of circulating interleukin-6 in patients with Hodgkin's disease. *Hematol Oncol* 1991;9:307-13.
 43. Barton BE, Murphy TF. Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine* 2001;16:251-57.
-

44. Barton BE. IL-6: Insights into Novel Biological Activities. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;85:16-20.

 45. Fiumara P, Cabanillas F, Younes A. Interleukin-13 levels in serum from patients with Hodgkin disease and healthy volunteers. *Blood* 2001;98:2877-78.
-



Anexos

Tabela A1 - Sexo e idade nos grupos de pacientes com LH clássico e indivíduos saudáveis doadores de sangue (grupo-controle).

Grupos (n)	Razão M:F	Idade						
		Média (anos)	DP (anos)	CV (%)	P ₂₅	P ₇₅	Mediana (anos)	Faixa etária (anos)
LH clássico (28)	1,9:1	33	11,5	35	22	40,2	33	19-57
Entre 19 a 39 anos (20)	1,8:1	26,6	6,4	24	22	33	24	19-39
Acima de 40 anos (9)	2:1	46,7	7	15	40,7	54,5	43	40-57
Grupo-controle (26)	1,8:1	33	10,9	33	23	40	33	18-53

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; P₂₅ e P₇₅: percentis 25 e 75, respectivamente. LH = Linfoma de Hodgkin

Tabela A 2 – Associação entre aspectos clínicos e laboratoriais e nível sérico de IL-6 e IL-10 ao diagnóstico para os 28 pacientes com linfoma de Hodgkin avaliados no presente estudo.

Categorias	n (%)	IL-6 sérica (pg/mL)	p	IL-10 sérica (pg/mL)	p
Idade					
19 a 39 anos	19 (68)	25,7 (13,7 – 42,3)	0,66	12,1 (6,6 – 25,2)	0,34
≥ 40 anos	9 (32)	19 (11,2 – 59,4)		22,8 (12,2 – 34,8)	
Sexo					
Masculino	18 (64)	19,7 (14,9 - 51,8)	0,94	14,4 (8,7 - 23)	0,85
Feminino	10 (36)	24,9 (12 - 42,8)		21,7 (0 - 47,5)	
Estadio de Ann-Arbor					
I - II	16 (57)	19,6 (5,1 - 39,6)	0,2	8,2 (2 - 24,8)	<u>0,06</u>
III - IV	12 (43)	30,9 (18,2 – 72,6)		20,2 (13,3 - 36,7)	
Envolvimento mediastinal					
Presente	16 (57)	24,9 (18,8 – 39,3)	0,73	11 (6,1 – 24,4)	0,4
Ausente	12 (43)	18,9 (5,1 - 63,8)		20,6 (11,5 – 39,7)	
Envolvimento abdominal					
Presente	14 (50)	39,3 (19,3 – 99,7)	0,03	20,6 (12,1 - 30,5)	0,1
Ausente	14 (50)	18,8 (<4 - 30,7)		8,2 (4 – 23)	
Hepatomegalia					

Categorias	n (%)	IL-6 sérica (pg/mL)	p	IL-10 sérica (pg/mL)	p
Presente	3 (11)	99,7 (55,7 - 217,1)	0,04	109,5 (36,5 - 214,9)	<u>0,09</u>
Ausente	25 (89)	20,2 (11,6 - 38,8)		14,6 (6,3 - 26,1)	
Esplenomegalia					
Presente	6 (21)	41,9 (24,2 - 99,7)	0,19	18,99 (8,7 - 109,5)	0,54
Ausente	22 (79)	19,7 (12 - 37,5)		14,8 (6,4 - 26,6)	
Doença extranodal					
Presente	8 (29)	41,5 (8,5 - 203,8)	0,3	22,9 (13,8 - 34,8)	0,15
Ausente	20 (71)	20,4 (13,5 - 38,8)		13,2 (4,9 - 28,2)	
Sintomas B					
Presentes	15 (54)	42,8 (19,6 - 95,3)	0,01	18,34 (11,1 - 39,9)	<u>0,06</u>
Ausentes	13 (46)	18,7 (7,7 - 25,8)		9,3 (3 - 23,6)	
Massa volumosa					
≥ 10 cm	5 (18)	12 (<4 - 24,2)	0,09	9,3 (8 - 36,4)	0,86
< 10 cm	23 (82)	25,7 (17,5 - 50,2)		15 (6,6 - 29,5)	
Infiltração de medula óssea					
Presente	3 (11)	37,5 (9,4 - 201,5)	0,71	9,9 (9,0 - 190)	0,77
Ausente	25 (89)	20,7 (14,2 - 43,4)		15 (6,3 - 27,6)	
Anemia					
Presente	8 (29)	75,7 (28,8 - 203,8)	0,02	34,8 (11,8 - 96)	<u>0,07</u>
Ausente	20 (71)	19,7 (11,2 - 36,6)		13,2 (6,1 - 22,9)	
Leucocitose					
≥15000/mm ³	4 (14)	28,6 (17,8 - 44,1)	0,78	22,8 (12,1 - 56,5)	0,34
<15.000/mm ³	24 (86)	22,2 (11,2 - 40,1)		14,4 (6,1 - 26,2)	
Linfocitopenia					
Presente	2 (7)	7,47 (<4 - 14,9)	0,12	11,8 (8,7 - 15)	0,69
Ausente	26 (93)	24,9 (17,1 - 45,4)		16,1 (6,4 - 30,5)	
Falha terapêutica					
Sim	4 (14)	39,6 (30,4 - 238,5)	0,12	17,6 (4,6 - 34,4)	0,89
Não	24 (86)	19,7 (11,2 - 43,2)		14,8 (6,8 - 28,6)	
Infecção pelo EBV*					
Presente	5 (21)	36,5 (14,7 - 177,7)	0,73	26,6 (13,2 - 98,1)	0,22
Ausente	18 (75)	22,5 (12 - 41)		13,2 (6,4 - 30,5)	

Categorias	n (%)	IL-6 sérica (pg/mL)	p	IL-10 sérica (pg/mL)	p
Inconclusivo	1 (4)	20,16		5,8	
Albumina sérica**					
Normal	10 (43)	20,4 (17,1 – 30,7)	0,1	8,2 (3,99 – 22,8)	0,04
Baixa	13 (57)	45,4 (17,8 – 112,7)		23 (13,7 – 52,9)	
β2-microglobulina†					
Normal	16 (89)	28,2 (17,9 – 48,6)	0,2	16,3 (6,9 – 34,4)	0,94
Alta	2 (11)	10,37 (<4 - 20,7)		19,6 (8,7 – 30,5)	
DHL\$					
Normal	15 (58)	20,2 (10,7 – 73)	1,0	17,6 (6 – 38,9)	0,53
Aumentada	11 (42)	20,74 (15,9 – 39,9)		15 (10 – 29,4)	
CD20#					
Negativo	16 (69)	19,9 (7,5 – 71,2)	0,97	22,9 (5,2 – 36,7)	0,64
Positivo	7 (31)	25,7 (14 – 35,1)		8,7 (6,1 – 59,8)	
Subtipo Histológico&					
LHEN	22 (79)	24,9 (17,1 – 45,4)		18 (6,4 – 30,5)	
LHCM	5 (18)	14,9 (7,7 – 24,7)	0,18	14,3 (9,1 – 14,7)	0,21
LHDL	1 (3)	99,7		109,5	

*: dados em 24 pacientes, teste estatístico ANOVA; **: dados em 23 pacientes; †: dados em 18 pacientes; \$: dados em 26 pacientes; #: dados em 23 pacientes; &: teste estatístico ANOVA; LHEN: esclerose nodular; LHCM: celularidade mista; LHDL: depleção linfocítica

Tabela A 3 - Dados clínicos, anátomo-patológicos, imunofenotípicos e de infecção pelo EBV para os 28 pacientes com LH avaliados.

Caso	Idade (anos)	Sexo	Subtipo LH	Estadio	Sint. B	Mediastino	Bulky	Abdome	Hepato-megalia	Espleno-megalia	Doença Extranodal	MO	IHQ CD45	IHQ CD15	IHQ CD30	IHQ CD20	HIS EBER1
1	40	F	LHEN	III	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
2	19	M	LHEN	II	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	pulmão/pele	Não	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	nd
3	24	M	LHEN	II	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
4	22	M	LHEN	II	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Inc.
5	46	M	LHEN	II	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	nd
6	21	F	LHEN	II	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
7	56	M	LHCM	IV	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
8	43	M	LHEN	II	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
9	23	M	LHEN	IV	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
10	21	M	LHEN	IV	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
11	22	F	LHEN	IV	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	fígado	Não	nd	nd	nd	nd	nd
12	22	M	LHEN	II	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
13	35	M	LHEN	II	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
14	41	M	LHEN	II	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	nd	nd	nd	nd	nd
15	33	M	LHEN	IV	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
16	40	M	LHEN	IV	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	adrenal	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
17	37	F	LHDL	III	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
18	25	F	LHEN	II	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
19	33	M	LHEN	IV	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	fígado	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
20	24	F	LHEN	II	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.
21	22	F	LHEN	II	Sim	Não	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
22	22	F	LHEN	III	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.

Caso	Idade (anos)	Sexo	Subtipo LH	Estadio	Sint. B	Mediastino	Bulky	Abdome	Hepato- megalia	Espleno- megalia	Doença Extranodal	MO	IHQ CD45	IHQ CD15	IHQ CD30	IHQ CD20	HIS EBER1
23	57	F	LHCM	II	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
24	54	F	LHEN	I	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.
25	35	M	LHCM	I	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
26	26	M	LHCM	III	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	nd	nd	nd	nd	Neg.
27	39	M	LHCM	III	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.
28	43	M	LHEN	II	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não	estômago	Não	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.

M: masculino. F: feminino. LHEN: esclerose nodular, LHCM: celularidade mista; LHD: depleção linfocítica.. Mediastino: ausência ou presença de doença mediastinal. Abdome: ausência ou presença de doença abdominal. Sint. B: presença de sintomas B. *Bulky*: massa maior que 10 cm. MO: infiltração de medula óssea. IHQ: imunohistoquímica. HIS EBER-1: hibridação *in situ* dirigida ao transcrito viral EBER-1. Neg.: negativo. Pos.: positivo. Inc.: inconclusivo. nd: não disponível.

Tabela A 4 - Dados laboratoriais e dosagem sérica de citocinas (IL-6, IL-10 e IL-13) pré e pós-tratamento dos 28 pacientes com linfoma de Hodgkin avaliados no estudo.

Caso	Albumina (g/dl)	DHL (U/L)	Hb (g/dl)	Leucócitos (cél./mm ³)	Linfócitos (cél./mm ³)	β2-microglob. (mg/L)	IL-6 sérica (pg/ml)		IL-10 sérica (pg/ml)		IL-13 sérica (pg/ml)	
							pré	pós	pré	pós	pré	pós
1	4,4	803	11,5	16.200	1.180	3,75	20,7	Indetectável	30,5	5	Indetectável	Indetectável
2	3,4	737	16,6	8.300	1.040	nd	Indetectável	Indetectável	23,0	4,6	Indetectável	Indetectável
3	4,1	712	15,7	17.400	1.392	1,85	36,5	Indetectável	9,3	Indetectável	Indetectável	Indetectável
4	4,6	479	14,5	9.200	920	nd	20,2	19,4	5,8	Indetectável	Indetectável	Indetectável
5	4,5	693	16,8	10.200	2.280	1,51	19	10,6	4	Indetectável	Indetectável	Indetectável
6	4,2	425	12,4	14.300	1.630	1,6	25,7	Indetectável	7,1	4,7	Indetectável	Indetectável
7	2,8	1675	10,2	31.100	933	3,31	14,9	Indetectável	15	Indetectável	Indetectável	Indetectável
8	3,0	996	4,8	22.300	2.890	2,11	51,8	16,2	82,6	10,5	Indetectável	Indetectável
9	2,5	940	7,2	3.600	641	nd	256,2	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
10	3,6	1058	9,5	2.100	544	8,86	Indetectável	20,2	8,7	21,7	Indetectável	Indetectável
11	3,4	348	11,1	11.800	1.770	1,08	45,4	Indetectável	17,6	Indetectável	Indetectável	Indetectável
12	3,9	539	14,4	9.600	1.699	1,46	18,7	17,1	6,4	7,8	Indetectável	Indetectável
13	4,5	511	14,7	8.000	1.600	nd	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
14	3,7	469	11,6	7.900	700	2,12	82,2	9,4	18,3	4,79	Indetectável	Indetectável
15	3,6	nd	12,5	12.200	1.818	1,64	37,5	Indetectável	9,9	Indetectável	Indetectável	Indetectável
16	4,3	567	12,4	4.900	936	1,47	17,1	25,9	22,8	8,05	Indetectável	Indetectável
17	3,0	376	7,8	5.300	700	2,49	99,7	Indetectável	109,5	Indetectável	Indetectável	Indetectável
18	nd	388	12,2	7.800	913	1,08	12	Indetectável	76,6	Indetectável	Indetectável	Indetectável
19	3,3	421	10,2	12.800	1.229	1,44	434,2	34,4	43	7,8	Indetectável	Indetectável
20	nd	474	12,2	11.800	2.089	2,2	30,7	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
21	nd	nd	10,2	11.800	3.120	nd	42,8	25,7	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
22	3,4	1.186	12,3	11.600	2.529	2,1	24,2	12,3	25,9	8,9	Indetectável	Indetectável

Caso	Albumina (g/dl)	DHL (U/L)	Hb (g/dl)	Leucócitos (célis/mm ³)	Linfócitos (célis./mm ³)	β2-microglob. (mg/L)	IL-6 sérica (pg/ml)		IL-10 sérica (pg/ml)		IL-13 sérica (pg/ml)	
							pré	pós	pré	pós	pré	pós
23	nd	450	15,3	6.600	2.079	1,36	Indetectável	8	Indetectável	Indetectável	Indetectável	Indetectável
24	3,8	180	13,6	5.300	1.590	nd	Indetectável	Indetectável	47,5	5,8	Indetectável	Indetectável
25	nd	204	13	5.000	1.350	nd	10,3	20,4	14,3	5,3	Indetectável	Indetectável
26	4,3	246	15,6	8.400	1.344	nd	41	Indetectável	12,1	14,6	Indetectável	Indetectável
27	nd	540	13,6	12.500	2.125	nd	19,3	Indetectável	14,6	11,2	Indetectável	Indetectável
28	1,8	180	9,2	8.500	850	nd	151,5	Indetectável	26,6	Indetectável	Indetectável	Indetectável

DHL: desidrogenase lática. Hb: hemoglobina. β2-microglob.: β2-microglobulina. Pré/pós: níveis médios antes e depois do tratamento antineoplásico, respectivamente.

Tabela A 5 - Níveis séricos de IL-6, IL-10 e IL-13 antes e depois do tratamento em 28 pacientes com linfoma de Hodgkin clássico.

Citocina	n¹	Concentração pré-tratamento (pg/mL)²	Concentração pós-tratamento (pg/mL)²	p³
IL-6 sérica	28	22,5 (13,5 - 44,1)	<4 (<4 - 16,7)	< 0,001
IL-10 sérica	28	14,8 (6,8 - 28,6)	<2 (<2 - 7,8)	< 0,001
IL-13 sérica	28	Indetectável ⁴	Indetectável ⁴	

¹ Número de pacientes com linfoma de Hodgkin clássico avaliados; ² Mediana e intervalo interquartilico das concentrações obtidas por ELISA; ³ Teste estatístico de Wilcoxon; ⁴ Abaixo do limite mínimo de detecção do ELISA.

Tabela A 6 - Resultados do teste do χ^2 para análise de multicolinearidade entre as variáveis disponíveis dos 28 pacientes com linfoma de Hodgkin do presente estudo. As relações de interdependência apresentaram $p < 0,05$.

	Sexo	Idade	Estadio	Med	Abd	Hepato	Espleno	Extra	Sint B	Bulky	MO	Alb	DHL	Anemia	Leuco	Linfo	Falha	EBER
Sexo	1																	
Idade	1	0,69																
Estadio	0,24	0,11	0,78															
Med	0,69	1	0,001	0,70														
Abd	1	0,53	0,07	0,24	0,22													
Hepato	0,63	0,14	0,06	0,67	0,016	0,006												
Espleno	0,19	1	0,04	0,23	0,21	1	1											
Extra	1	1	0,11	0,96	0,023	1	0,65	0,038										
Sint B	0,63	0,14	0,35	1	0,33	1	1	0,61	0,64									
Bulky	0,53	0,53	0,07	1	0,22	0,3	0,1	0,017	0,23	0,46								
MO	0,65	0,68	0,21	1	0,1	1	0,34	0,07	0,003	1	0,23							
Alb	0,22	1	0,11	0,05	0,26	0,55	0,13	1	0,43	0,62	0,17	0,7						
DHL	0,67	1	0,23	0,69	0,03	0,19	0,038	0,17	0,002	1	0,19	0,007	0,4					
Anemia	1	0,08	1	0,61	1	1	0,56	0,29	0,6	1	1	1	0,02	0,55				
Leuco	0,52	1	0,17	1	0,48	1	0,39	0,50	0,48	0,33	0,2	0,49	0,17	0,07	0,27			
Linfo	0,6	0,27	1	1	0,6	1	0,19	1	1	1	1	1	0,56	0,55	0,48	1		
Falha	0,61	0,61	1	1	1	0,52	1	0,52	1	1	0,52	1	0,6	1	1	1	1	
EBER	1	1	0,47	0,18	0,47	1	0,31	0,49	0,48	0,31	0,22	1	0,15	0,49	0,4	0,22	1	1
$\beta 2$ -mic																		

Med: doença mediastinal; Abd: doença abdominal. Hepato: hepatomegalia. Espleno: esplenomegalia. Extra: doença extranodal. Sint B: sintomas B. Bulky: massa superior a 10 cm. MO: acometimento de medula óssea. Alb: albumina sérica. DHL: desidrogenase láctica. Leuco: leucocitose. Linfo: linfocitopenia. Falha: falha terapêutica. EBER: positividade para EBER-1 por hibridação *in situ*. $\beta 2$ -mic: $\beta 2$ -microglobulina.

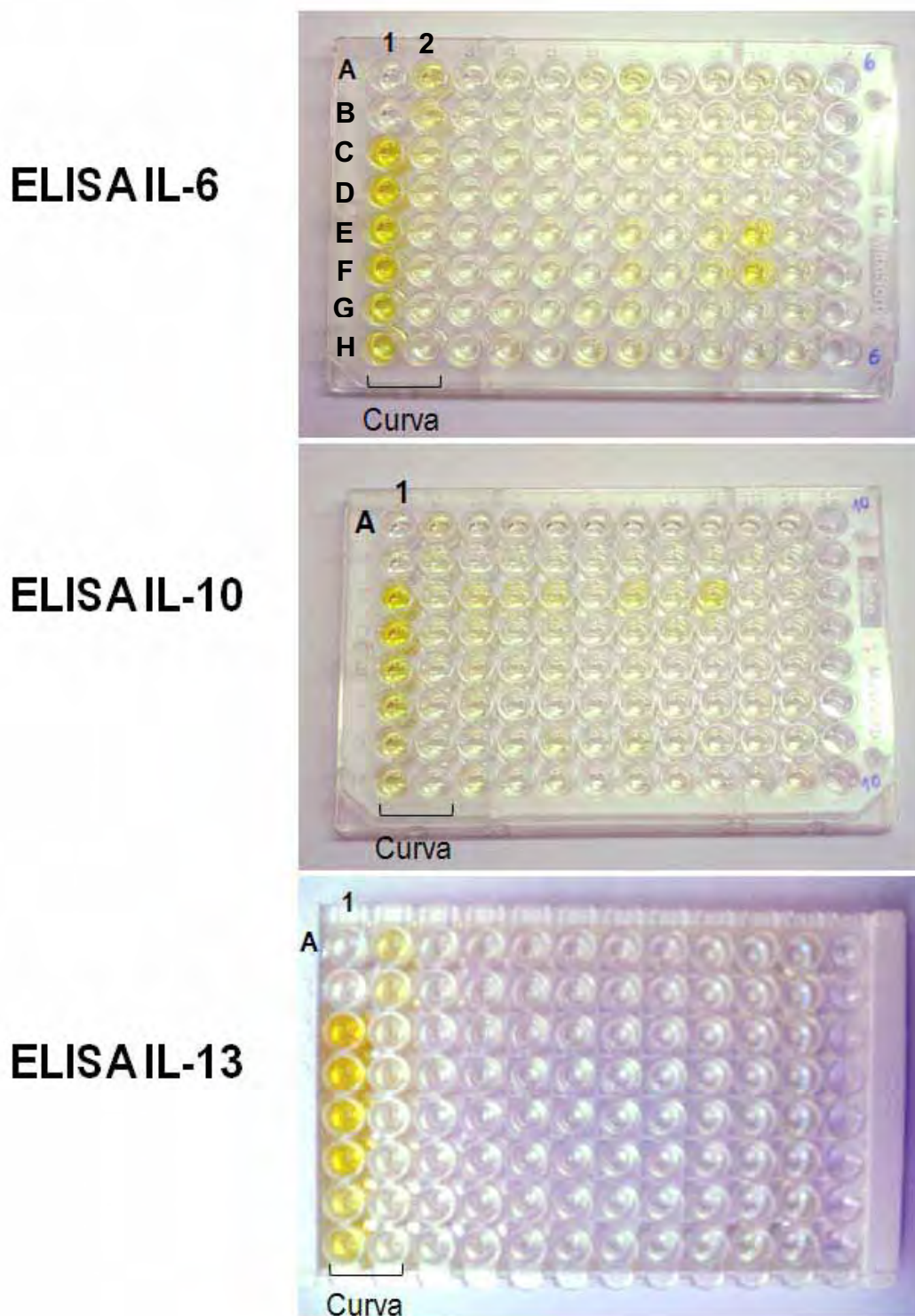


Figura A 1 - Experimentos representativos de quantificação sérica de IL-6, IL-10 e IL-13 pelo método de ELISA. Os poços 1A e 1B representam o controle negativo. Os poços 1C a 2H representam as diluições seriadas das citocinas-padrão, dosadas em duplicatas. Os demais poços representam as amostras do grupo-controle e dos pacientes com linfoma de Hodgkin.

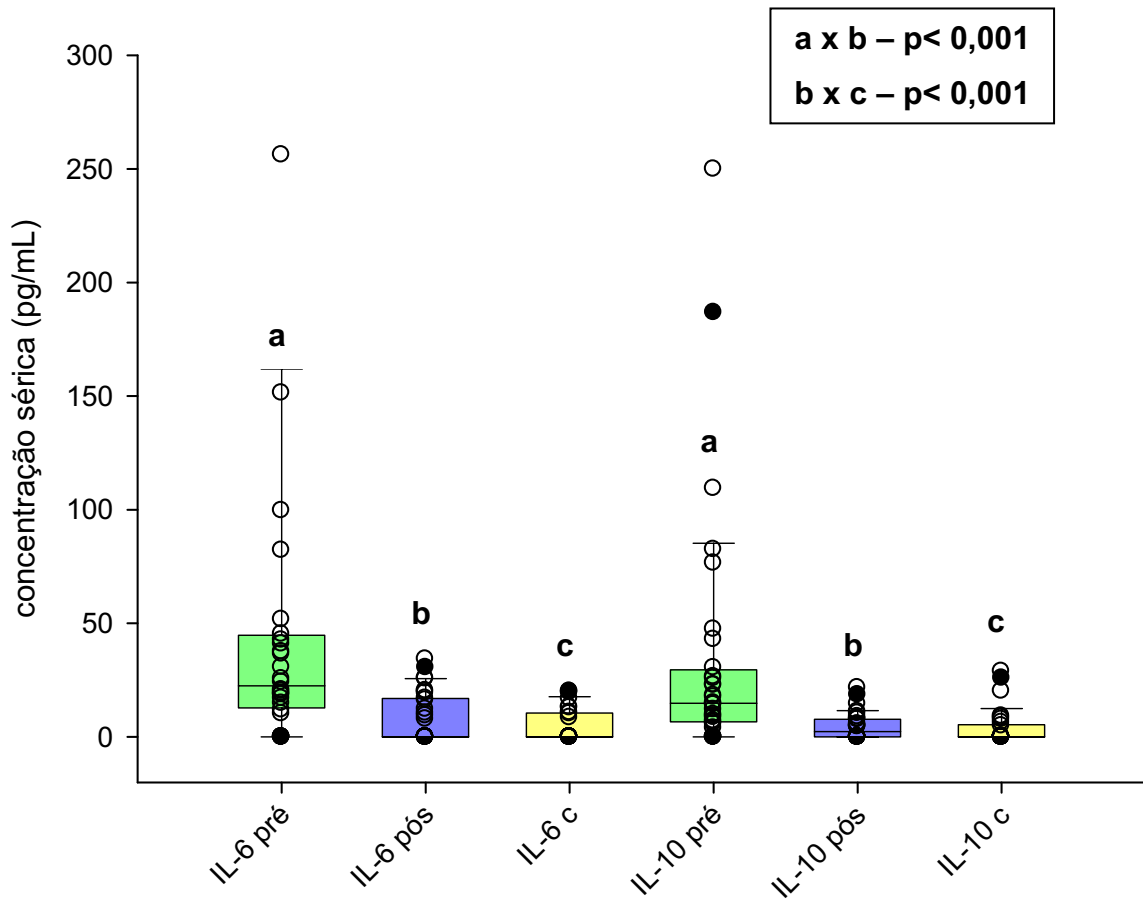


Figura A 2 - Dosagens de IL-6 e IL-10 dos pacientes com linfoma de Hodgkin antes e depois do tratamento e grupo-controle. As barras representam mediana e intervalo interquartilico e os círculos representam os valores individuais das dosagens séricas.

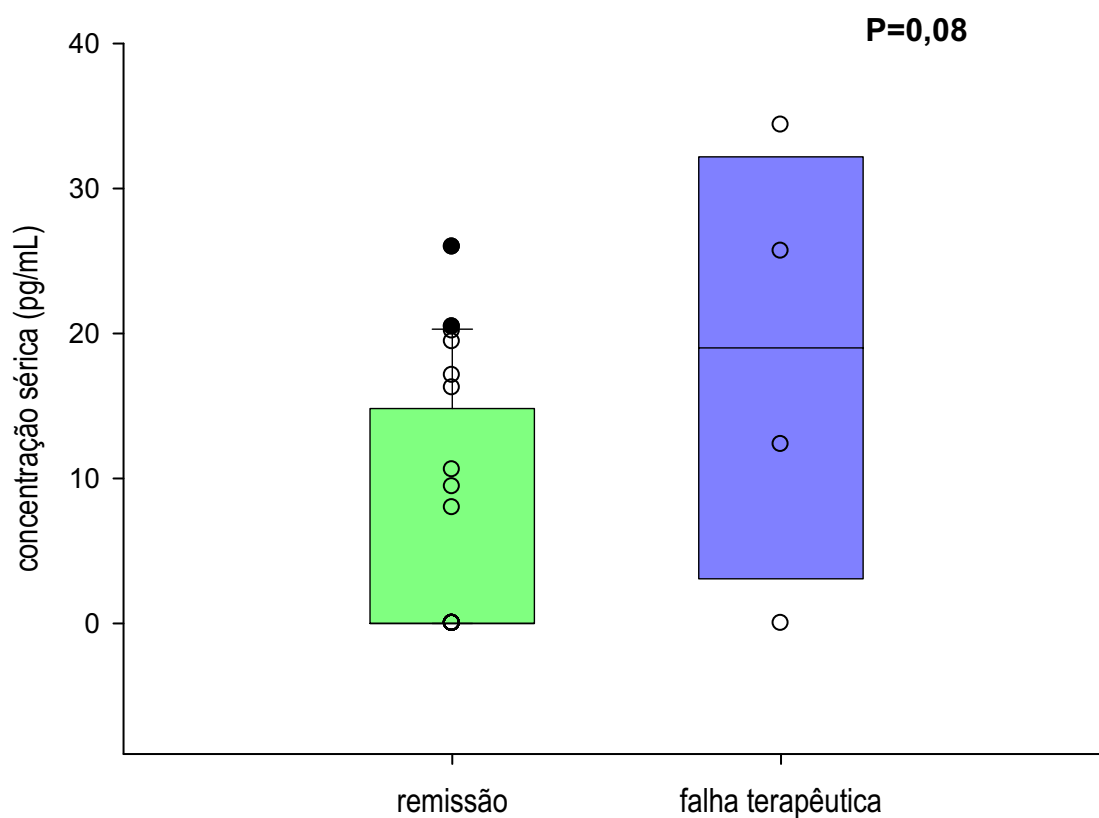


Figura A 3 – Comparação entre as dosagens de IL-6 dos 28 pacientes com linfoma de Hodgkin avaliados. As barras representam mediana e intervalo interquartílico e os círculos representam os valores individuais das dosagens séricas.

Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.



**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 08 de maio de 2.006

OF.194/2006-CEP

*Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu*


Prezado Dr. Deilson,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Análise do nível sérico de citocinas na apresentação e evolução do linfoma de Hodgkin clássico", a ser conduzido por Rafael Dezen Gaiolla, orientado por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Profs. Drs. Lígia Niero de Melo e Maria Aparecida Custódio Domingues, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 08 de maio de 2.006.

Situação do Projeto: APROVADO.

- Ao término deste projeto, apresentar ao CEP Relatório Final de Atividades.*

Atenciosamente,


*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP*

Anexo 3 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Amaral Carvalho



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Fundação Hospital Amaral Carvalho

Rua do Palmeiras, 116, Vila Assis - CEP 17.210-120 - Jau / SP - ☎ (014) 3602-1194 - Ramal - 1552

Parecer CEPFHAC – 058/06.

Projeto de Pesquisa *“Análise do Nível Sérico de Citocinas na Apresentação e Evolução do linfoma de Hodgkin Clássico”.*

Pesquisador: Dr. Rafael Dezen Gaiolla

Orientador: Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira

Documentos avaliados:

- ✓ Ofício de Encaminhamento
- ✓ Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Versão outubro de 1999);
- ✓ Projeto de Pesquisa;
- ✓ Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- ✓ Termo de Confidencialidade
- ✓ Orçamento Financeiro da Pesquisa;
- ✓ Autorização do Chefe de Serviço;
- ✓ Currículo dos Participantes

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Amaral Carvalho analisou o projeto de pesquisa supracitado na 22ª reunião ordinária realizada no dia 04 de agosto de 2006. Segue abaixo as considerações feitas no parecer consubstanciado elaborado pela relatora “ad hoc” Dra. Ana Lúcia Coradazzi:

“O presente projeto tem como objetivo estudar os níveis séricos das citocinas IL-13, IL-10, IL-6 e IL-3 durante o diagnóstico e a evolução do linfoma de Hodgkin (LH) clássico, além de sua possível associação com características anátomo-clínicas da doença e ou seus fatores prognósticos.

Trata-se de um estudo prospectivo, no qual serão incluídos pacientes com LH virgens de tratamento provenientes de três instituições (Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP, Hospital Amaral Carvalho / Jau e Hospital e Maternidade Celso Pierro / PUC Campinas), no período de 18 meses.

As dosagens séricas de citocinas serão realizadas ao diagnóstico, após o tratamento e a cada 3 meses após o término do mesmo durante o ano seguinte. Sua quantificação será feita por ELISA.

A confirmação do diagnóstico histopatológico será feita por imunohistoquímica.

Será ainda realizada detecção do Epstein-Barr virus (EBV) na biópsia ganglionar por técnica de hibridização in situ.

Os dados anátomo-clínicos, imunohistoquímicos e de citocinas serão confrontados ao término de cada seguimento.

O objetivo do estudo é pertinente e está devidamente alicerçado nos dados disponíveis na literatura atual. O levantamento bibliográfico é adequado e atual.

O desenho do estudo é claro e objetivo, tendo sido adequadamente descrito para o fim a que se propõe. No entanto, na página 10, 3º parágrafo, é descrito que será realizado estadiamento pelo sistema Ann-Arbor, incluindo citilografia com gálio 67. Este procedimento não é realizado rotineiramente para estadiamento de LH no Hospital Amaral Carvalho.

O desenho do estudo não prevê outros procedimentos invasivos adicionais aos realizados rotineiramente em pacientes com LH em tratamento, exceto pela citilografia com gálio 67 descrita acima e pela retirada de uma amostra de sangue periférico adicional, que será coletada junto com exames rotineiros, não implicando em punção venosa adicional para o paciente.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi escrito com linguagem acessível aos pacientes, e contém informações precisas sobre os objetivos e desenho do estudo, caráter voluntário da participação dos pacientes, garantia de sigilo e ausência de bonificação pela participação.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Bonucatu / UNESP em 08 de maio de 2006. Foi também apresentado orçamento financeiro, no qual há isenção do Hospital Amaral Carvalho / Jaú de qualquer ônus financeiro relacionado ao projeto.

Foi enviado documento de autorização do responsável pelo Serviço de Hematologia do Hospital Amaral Carvalho, já assinado pelo mesmo.

Sugerimos que a realização de cintilografia com Gália 67 ao estadiamento não seja obrigatória para inclusão no estudo, uma vez que não temos disponibilidade do exame de forma rotineira.

Resolvida esta pendência, a sugestão deste parecer é de que o projeto seja APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa”.

Diante do exposto, manifestamo-nos pela aprovação com restrições do estudo em questão.

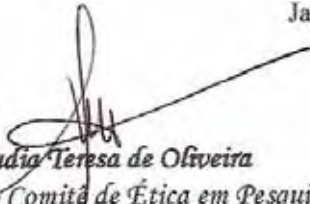
O estudo só poderá ser iniciado após cumpridas as sugestões acima mencionadas pela relatora “ad hoc”, Dra. Ana Lúcia Coradazzi.

Informamos que o referido estudo é rubricado pelo colaborador do CEPFHAC, Ricardo Augusto Sartori, e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Situação do Estudo: Aprovado com recomendação

Jau, 04 de agosto de 2006.



Dra. Cláudia Teresa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hospital Amaral Carvalho

Anexo 4 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, sobre inclusão de Grupo Controle

	Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu	
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br		
		Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997

Botucatu, 03 de dezembro de 2.007

OF. 470/2007-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Deilson Elgui de Oliveira
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezado Dr. Deilson,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP informo que nesta data (03/12/2007) foi autorizada a inclusão de um **"Grupo Controle"** ao Projeto de Pesquisa **"Análise do nível sérico de citocinas na apresentação e evolução do linfoma de hodgkin clássico"** que será conduzido pelo Dr. Rafael Dezen Gaiolla, orientado por Vossa Senhoria com a participação dos Drs. Lígia Niero de Mello e Maria Aparecida Custódio Domingues, aprovado por este CEP em 08/05/06.

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.

Anexo 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: “Análise do nível sérico de citocinas na apresentação e evolução do Linfoma de Hodgkin clássico”

Nome da Instituição:

Nome do Pesquisador: Dr. Rafael Dezen Gaiolla

Nome do Paciente: _____

Fui informado(a) pelo meu médico que tenho Linfoma de Hodgkin, um tipo de câncer que ocorre no sistema linfático. É uma doença tratada com quimioterapia e que apresenta, em geral, grandes chances de cura. Existem alguns casos, porém, em que a resposta ao tratamento não é boa, sendo necessárias mudanças no tipo da quimioterapia, com resultados menos favoráveis.

Estou sendo convidado(a) a participar de um estudo no qual serão realizadas dosagens de **CITOCINAS**, substâncias do sistema imunológico produzidas pelo organismo. Entendi que o nível de algumas citocinas está alterado em pacientes com Linfoma de Hodgkin, de modo que o objetivo do estudo é avaliar se essas alterações se relacionam com o comportamento da doença e/ou resposta ao tratamento. Fui informado(a) de que as informações levantadas nesse estudo possibilitarão um melhor entendimento do Linfoma de Hodgkin.

Fui assegurado(a) de que terei acesso a todas as informações que julgar necessárias para melhor decidir sobre minha participação ou não no estudo e que, de fato, **não sou obrigado(a) a participar**.

Dessa forma, uma vez esclarecido(a) pelo médico responsável, declaro ter ciência que:

- As coletas de amostras de sangue serão realizadas antes e depois do tratamento, a cada 3 meses, junto com as coletas habituais.
- Não serei submetido(a) a nenhum tipo de desconforto ou risco, além dos riscos habituais de qualquer coleta de sangue;
- As possíveis alterações encontradas nas citocinas dosadas não modificarão meu tratamento;
- Minha participação nesse estudo é voluntária e, a qualquer momento, posso me retirar do mesmo sem que isso comprometa o meu tratamento;
- Estou autorizando a utilização de amostras de sangue e de tecidos que porventura já estejam estocadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP ou Hospital Amaral Carvalho de Jaú.
- Tenho garantido o sigilo de minha identidade e privacidade com relação aos resultados obtidos a partir de minhas amostras biológicas;
- Qualquer dado do meu prontuário, mesmo anteriores à assinatura desse termo, poderão ser utilizados no estudo, respeitando-se os termos de privacidade e confidencialidade;
- Assim como o pesquisador, não receberei qualquer forma de bonificação pela minha participação no estudo;

Observação: Você pode fazer as perguntas que quiser sobre o estudo, a qualquer momento. Em caso de dúvidas, ligue para a Seção Técnica de Quimioterapia na UNESP - Botucatu pelo telefone (14) 3811-6234 e fale com o Dr. Rafael Dezen Gaiolla.

Eu li as informações acima e entendi o propósito de estudo, bem como os possíveis riscos e benefícios de minha participação. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas elas me foram respondidas de uma forma que eu entendi.

Eu autorizo o médico Dr. Rafael Dezen Gaiolla a coletar e processar meus dados, incluindo informações sobre minha saúde.

Ao assinar esse termo, eu forneço meu consentimento livre e esclarecido para participar desse estudo.

Eu receberei uma cópia deste documento assinado e datado. Assinando esse termo de consentimento eu não estou desistindo de nenhum dos meus direitos legais.

Nome do paciente:

Assinatura:

Data:

Eu, abaixo assinado, expliquei todos os detalhes relevantes deste estudo para o(a) paciente acima.

Nome do(a) representante legal (se aplicável)

Assinatura do(a) representante legal (se aplicável)

Data

Eu, abaixo assinado, expliquei todos os detalhes relevantes deste estudo para o(a) paciente identificado(a) acima (e/ou seu representante legal) e forneci a este(a) paciente uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido datado e assinado.

Nome do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

Dr. Rafael Dezen Gaiolla

Travessa Cyro Targa, 115, Jd Paraíso - Botucatu / SP

Fone – (14) 3814-7627 – 8123-0033 / rgaiolla@fmb.unesp.br

Anexo 6 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: “Análise do nível sérico de citocinas na apresentação e evolução do Linfoma de Hodgkin clássico”

Nome da Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Nome do Pesquisador: Rafael Dezen Gaiolla

Nome do Voluntário: _____

Trata-se de um estudo com pacientes com Linfoma de Hodgkin, um tipo de câncer que ocorre no sistema linfático. É uma doença tratada com quimioterapia e que apresenta, em geral, grandes chances de cura. Existem alguns casos, porém, em que a resposta ao tratamento não é boa, sendo necessárias mudanças no tipo da quimioterapia, com resultados menos favoráveis.

Nesse estudo será realizada a dosagem de algumas **CITOCINAS**, substâncias do sistema imunológico produzidas pelo organismo. O nível de algumas citocinas está alterado em pacientes com Linfoma de Hodgkin quando comparados a indivíduos sem a doença, de modo que o objetivo do estudo é avaliar se essas alterações se relacionam com o comportamento da doença e/ou resposta ao tratamento.

Estou sendo convidado a participar desse estudo, de forma voluntária, como parte de um grupo controle. Isso significa que meus dados e resultados de exames servirão de comparação aos dados obtidos dos pacientes tratados no presente estudo. Fui informado(a) de que as informações levantadas nesse estudo possibilitarão um melhor entendimento do Linfoma de Hodgkin.

Foi-me esclarecido que serei submetido a uma breve avaliação clínica para averiguar a existência de algum problema de saúde ou uso de medicação que possam alterar as dosagens de citocinas.

Fui assegurado(a) de que terei acesso a todas as informações que julgar necessárias para melhor decidir sobre minha participação ou não no estudo e que, de fato, **não sou obrigado(a) a participar.**

Dessa forma, uma vez esclarecido(a) pelo médico responsável, declaro ter ciência que:

- Será realizada avaliação clínica sumária sobre medicações em uso e possíveis problemas de saúde;
- Será realizada uma única coleta de amostra de sangue, com finalidade exclusiva para dosagem de citocinas;
- Não serei submetido(a) a nenhum tipo de desconforto ou risco, além dos riscos habituais de qualquer coleta de sangue;
- Minha participação nesse estudo é voluntária e, a qualquer momento, posso me retirar do mesmo;
- Tenho garantido o sigilo de minha identidade e privacidade com relação aos dados clínicos e resultados obtidos a partir de minhas amostras biológicas;
- Assim como o pesquisador, não receberei qualquer forma de bonificação pela minha participação no estudo;

Observação: Você pode fazer as perguntas que quiser sobre o estudo, a qualquer momento. Em caso de dúvidas, ligue para a Seção Técnica de Quimioterapia na UNESP - Botucatu pelo telefone (14) 3811-6038 e fale com o Dr. Rafael Dezen Gaiolla.

Eu li as informações acima e entendi o propósito de estudo, bem como os possíveis riscos e benefícios de minha participação. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas elas me foram respondidas de uma forma que eu entendi.

Eu autorizo o médico Dr. Rafael Dezen Gaiolla a coletar e processar os dados referentes aos resultados da amostra de sangue doada.

Ao assinar esse termo, eu forneço meu consentimento livre e esclarecido para participar desse estudo.

Eu receberei uma cópia deste documento assinado e datado. Assinando esse termo de consentimento eu não estou desistindo de nenhum dos meus direitos legais.

Nome do voluntário _____ Assinatura do voluntário _____ Data _____

Eu, abaixo assinado, expliquei todos os detalhes relevantes deste estudo para o(a) voluntário acima.

Eu, abaixo assinado, expliquei todos os detalhes relevantes deste estudo para o(a) voluntário identificado(a) acima (e/ou seu representante legal) e forneci a este(a) uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido datado e assinado.

Nome do pesquisador _____ Assinatura do pesquisador _____ Data _____

Dr. Rafael Dezen Gaiolla

Travessa Cyro Targa, 115, Jd. Paraíso - Botucatu / SP

Fone – (14) 3814-7627 – 8123-0033 / rgaiolla@fmb.unesp.br