

GLEND A NICIOLI DA SILVA

**Avaliação de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs)
na região promotora do gene da Interleucina 10
em pacientes com Linfoma de Hodgkin**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia, Área de Concentração Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), para obtenção do título de Mestre.

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. MAURA MOSCARDI
BACCHI**

Botucatu/SP
Julho de 2004

**Avaliação de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs)
na região promotora do gene da Interleucina 10
em pacientes com Linfoma de Hodgkin**

ÍNDICE

1	CAPÍTULO 1.....	3
1.1	Revisão da literatura.....	3
1.1.1	Linfoma de Hodgkin.....	4
1.1.2	Linfoma de Hodgkin e Vírus de Epstein-Barr (EBV).....	7
1.1.3	Linfoma de Hodgkin e Interleucinas.....	9
1.1.4	SNPs em genes codificadores de citocinas.....	11
1.2	Referências Bibliográficas*.....	16
2	CAPÍTULO 2.....	26
2.1	Manuscrito.....	26
2.1.1	Resumo.....	28
2.1.2	Summary.....	29
2.1.3	Introdução.....	30
2.1.4	Materiais e Métodos.....	32
2.1.5	Resultados.....	36
2.1.6	Discussão.....	43
2.1.7	Referências Bibliográficas.....	46
3	CAPÍTULO 3.....	50
3.1	Anexos.....	50

1 Capítulo 1

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Linfoma de Hodgkin

Embora o linfoma de Hodgkin (LH) tenha sido descrito em 1832 por Thomas Hodgkin (HODGKIN, 1832), a caracterização de seu componente neoplásico - as células de Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS) - continua sendo difícil, uma vez que constitui somente 2% da massa tumoral (Figura 1). Geralmente, as células HRS estão de permeio a células inflamatórias, como linfócitos, plasmócitos, macrófagos, granulócitos e fibroblastos (HALUSKA et al., 1994; FLAVELL & MURRAY, 2000). Recentes estudos demonstraram que as células HRS têm origem clonal (INGHIRAMI et al., 1994; PAPADAKI & STAMATOPOULOS, 2003) e devem derivar de linfócitos B do centro germinativo (KUPPERS & RAJEWSKY, 1998; THOMAS et al., 2004).

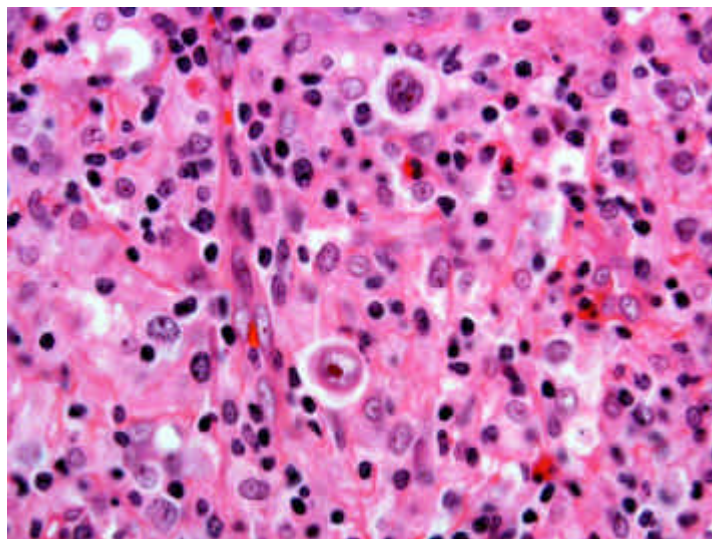


Figura 1 – Linfoma de Hodgkin clássico, subtipo celularidade mista. Aspecto geral do tumor e das células neoplásicas de H-RS. Na porção inferior, e superior do campo são observadas, respectivamente, uma célula de Hodgkin (uninucleada) e célula de Reed-Sternberg (binucleada) (H&E, 400x).

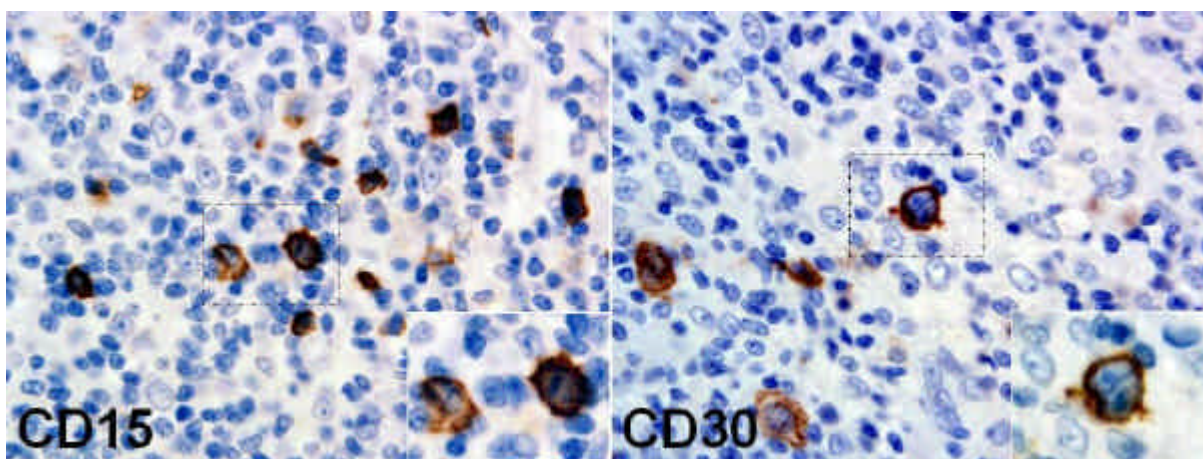


Figura 2 – Imunoperoxidase, em padrão de membrana e citoplasmático, dos marcadores CD15 e CD30 nas células H-RS do linfoma de Hodgkin clássico. (Imunoperoxidase, 400x).

O LH é classificado em duas formas clínico-patológicas: o linfoma de Hodgkin clássico e o linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular. Há fortes evi-

dências de que esta última forma seja entidade distinta, pois possui curso clínico característico (WEISS et al., 1991). O LH clássico é dividido ainda nos subtipos esclerose nodular, celularidade mista, depleção linfocítica e LH rico em linfócitos, que apresentam o mesmo padrão de rearranjos dos genes das imunoglobulinas, expressão de CD15 e CD30 e ausência de expressão de CD20 e CD45 (Figura 2) (YUNG & LINCH, 2003).

Com relação aos subtipos clássicos do LH, algumas características podem ser destacadas. O LH esclerose nodular, subtipo mais comum da doença, normalmente se apresenta como doença localizada que envolve os nódulos linfáticos das regiões cervical, supraclavicular e mediastinal. O LH subtipo celularidade mista frequentemente se revela como doença em estágio avançado. O LH subtipo depleção linfocítica é raro e caracteriza-se por doença extensa; em alguns casos está associado com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O LH rico em linfócitos, último subtipo do LH clássico a ser descrito na literatura, apresenta-se como nódulos linfáticos repletos de pequenos linfócitos, alguns exibindo características morfológicas de células foliculares do manto (BRAUNINGER et al., 2003).

O LH predominância linfocítica nodular afeta nódulos linfáticos em regiões cervical e mediastinal. Caracteriza-se pela presença de população de grandes células neoplásicas, denominadas células linfocíticas/histiocíticas (L&H) (Figura 3). Embora o LH predominância linfocítica nodular morfológicamente se assemelhe ao LH subtipo rico em linfócitos, as células L&H expressam CD45 e CD20, mas não expressam CD30 e CD15, imunofenótipo distinto das células HRS encontradas nas formas clássicas do LH (EKSTRAND & HORNING, 2002).

O diagnóstico do LH e dos seus subtipos morfológicos é definido pelo exame anatomo-patológico e pelo estudo do imunofenótipo por imunistoquímica. Clinicamente, muitos pacientes apresentam linfadenopatia assintomática em região cervical ou supraclavicular, frequentemente acompanhada de massas mediastinais detectadas por radiografia do tórax. Dentre os sintomas comumente observados estão tosse, dispnéia, fadiga, febre intermitente, perda de peso, sudorese noturna e prurido (DIEHL et al., 2004).

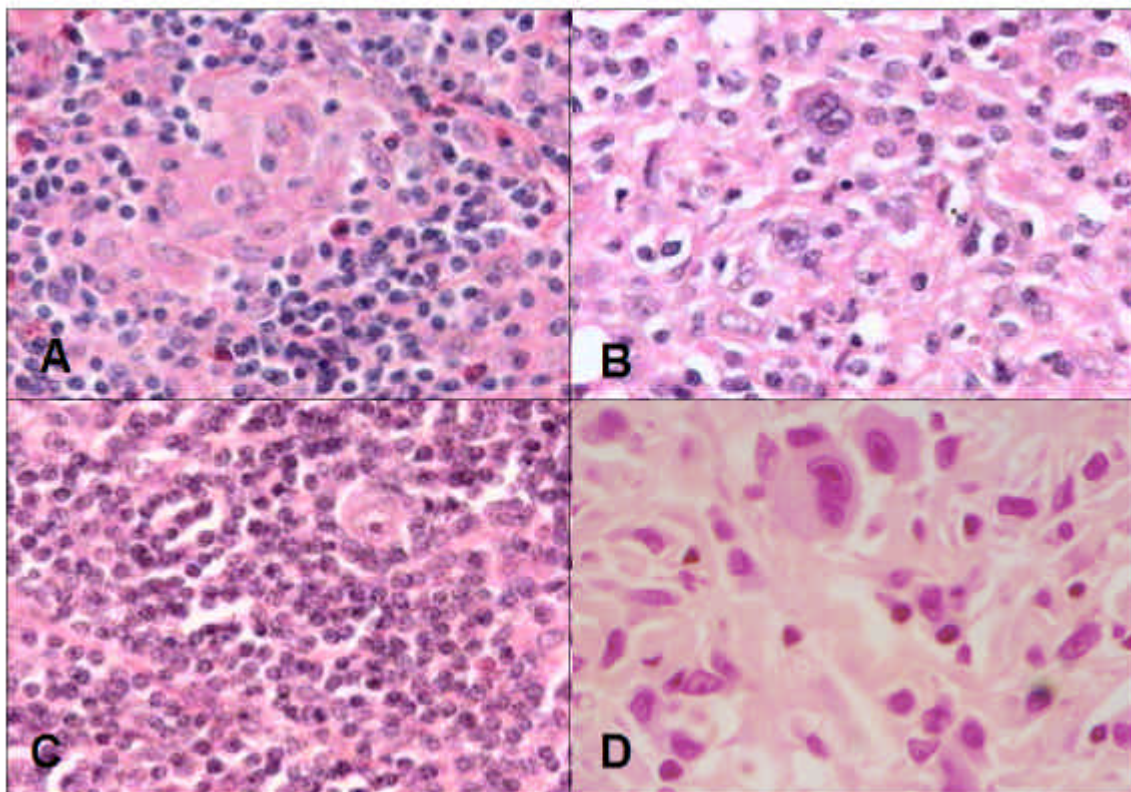


Figura 3 – A, B, C e D (Hematoxilina-eosina; aumento de 400x) - A) Linfoma de Hodgkin subtipo celularidade mista; B) Linfoma de Hodgkin subtipo esclerose nodular; C) Linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular; D) Linfoma de Hodgkin subtipo depleção linfocítica.

O curso clínico do LH se correlaciona com o subtipo morfológico, mas principalmente com o estadiamento clínico: 90% dos pacientes com doença localizada são curados, ao passo que somente 60% dos pacientes com doença avançada apresentam bom prognóstico. Em relação ao tratamento, as maiores dificuldades são observadas nos casos avançados, que não respondem aos protocolos terapêuticos preconizados ou que apresentam recaídas tardias. O desenvolvimento de neoplasias secundárias pós-quimioterapia ou radioterapia (e.g., câncer de pulmão, leucemia mielóide secundária, câncer de mama, neoplasias de cabeça e pescoço, câncer de cólon, estômago e tireóide entre outras) representam complicações a longo prazo, notadamente no grupo etário mais jovem (DIEHL et al., 2004).

Em países desenvolvidos é relatada elevada incidência de LH em jovens adultos; nos países em desenvolvimento, por outro lado, o pico de incidência é na infância, entre 7 e 12 anos (MCMAHON, 1966; MCKINNEY et al., 1989). A distribuição dos subtipos histológicos do LH também varia de acordo com a faixa etária: LH

esclerose nodular predomina em adolescentes e jovens adultos, ao passo que LH celularidade mista é mais comum em crianças e adultos mais velhos (GLASER & SWART, 1990). Os subtipos depleção linfocítica e rico em linfócitos predominam em adultos mais velhos (EKSTRAND & HORNING, 2002). O sexo masculino tem maior incidência que o sexo feminino, exceto para o subtipo esclerose nodular, que ocorre mais frequentemente em mulheres jovens (THOMAS et al., 2002).

1.1.2 Linfoma de Hodgkin e Vírus de Epstein-Barr (EBV)

O vírus de Epstein-Barr (EBV) é um herpesvírus gama do gênero *Lymphocryptovirus*. Seu genoma é constituído por DNA de fita dupla com cerca de 172Kb (PURTILO et al., 1992; YOUNG & MURRAY, 2003). É um microorganismo ubíquo que infecta a maioria dos indivíduos na idade adulta. Após a infecção primária, o indivíduo permanece como portador vitalício do vírus. Em geral, a infecção primária pelo EBV é, assintomática ou o indivíduo pode desenvolver mononucleose infecciosa, caracterizada por quadro clínico de febre e linfadenomegalia. Em países em desenvolvimento a infecção primária geralmente ocorre nos primeiros anos de vida. O EBV é transmitido por via oral, sendo detectado em secreções de orofaringe (THOMPSON & KURZROCK, 2004).

Vários estudos relatam associação do EBV com LH. O vírus está presente nas células de HRS em aproximadamente 50% dos casos e a infecção pelo EBV apresenta associação significativa com o subtipo celularidade mista (Figura 4) (WEISS et al., 1991). Armstrong et al. (1993) sugerem que o EBV desempenha papel importante na patogênese do LH em crianças com até 10 anos, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Neste estudo, os casos de LH infantil exibem associação com EBV em 88,9% dos casos. Herbst et al. (1990) relataram que 60% dos casos de LH estudados foram positivos para EBV, independentemente da idade e do sexo do paciente. Carbone et al. (1996) encontraram genoma viral em 5 de 5 casos estudados de LH em adultos.

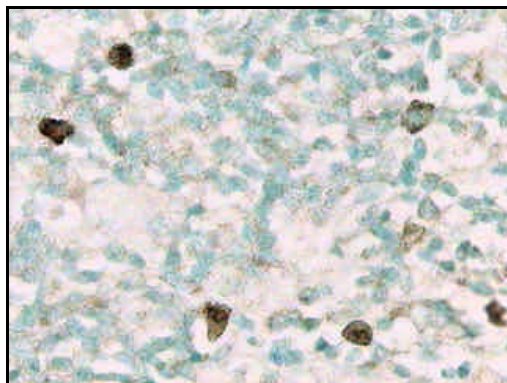


Figura 4 – Hibridação *in situ* com sonda biotinilada complementar ao transcrito do gene EBER-I do EBV em caso de linfoma de Hodgkin subtipo celularidade mista. Células HRS EBV-positivas apresentam deposição nuclear do cromógeno (3,3' diaminobenzidina) nos sítios de ligação da sonda-RNA viral (contra-coloração com verde-metila; aumento de 400x)

A frequência de casos de LH EBV-positivos apresenta considerável variação sócio-geográfica: o vírus está associado a 40-60% de casos de LH em pacientes imunocompetentes no Ocidente e em até 95% dos casos em países em desenvolvimento (KHAN & COATES, 1994). No Peru, o EBV foi identificado em 94% de casos de LH, sendo que 63% dos pacientes tinham menos de 21 anos e o subtipo celularidade mista o mais freqüente (CHANG et al., 1993). Estudo realizado no Brasil comparando casos de LH em jovens e adultos no Ceará (perfil sócio-econômico de país em desenvolvimento) e em São Paulo (melhor condição sócio-econômica do país) verificou que, em geral, 64% dos casos eram EBV-positivos. LH celularidade mista foi o subtipo mais freqüente nos jovens do Ceará e entre jovens e adultos de São Paulo. Ainda, LH subtipo esclerose nodular foi mais freqüente em adultos do Ceará. Os autores demonstraram que a taxa de infecção pelo EBV, faixa etária dos pacientes e subtipos histológicos do LH variam com a região geográfica (ELGUI DE OLIVEIRA et al., 2002). Nesse sentido, Glaser et al. (1997) sugerem que idade, sexo, etnia e estilo de vida podem propiciar a infecção pelo EBV, explicando a forte associação do subtipo do LH à infecção viral.

Por outro lado, a patogenia dos casos de LH sem associação com infecção pelo EBV ainda precisa ser esclarecida. Embora tenha sido sugerido o envolvimento de outros agentes infecciosos, nenhum foi identificado até o momento (JARRET, 2002; GALLAGHER et al., 2002). Em alguns casos avaliados de LH pediátrico, Gan et al. (2002) encontraram rearranjos heterogêneos do DNA do EBV (het), que justapõem fragmentos *Bam*HI W e Z do genoma do EBV e ocasionam a expressão do gene BZLF1, que pode ocasionar perda do DNA epissomal do vírus nas células tumorais infectadas. Entretanto, há evidências de que alguns pacientes com LH nunca foram infectados pelo EBV, o que não sustenta a hipótese do mecanismo *hit-and-run*

em casos da doença em que o vírus não foi detectado (GALLAGHER et al., 2003). Alguns autores sugerem que pacientes EBV-negativos tenham uma boa resposta imunitária contra o vírus, eliminando eficientemente as células infectadas (JARRET, 2002). Foi demonstrado que a sobrevida de pacientes com LH não varia significativamente com a presença do EBV, tanto em relação ao sexo quanto a idade. Entretanto, sugere-se que a sobrevida livre de doença em 5 anos é melhor em casos EBV-positivos, principalmente no grupo de adultos jovens do sexo masculino (FLAVELL et al., 2003; KRUGMANN et al., 2003).

Em células HRS, o padrão de expressão de produtos virais compreende o antígeno nuclear de membrana 1 (*EBV nuclear antigen 1* - EBNA1), proteínas latentes de membrana 1, 2A e 2B (*Latent membrane proteins* - LMP-1, LMP-2A e LMP-2B) e pequenos RNAs codificados pelo EBV (*EBV small encoded-RNAs* – EBERs) (DOLCETTI & BOIOCCHI, 1998). Estudos indicam que as células H-RS do LH subtipos celularidade mista e esclerose nodular exibem características imunofenotípicas e moleculares de linfócitos B. Adicionalmente, acredita-se que o EBV participa da transformação celular, pois células neoplásicas EBV-positivas expressam a proteína viral LMP-1, que exibe propriedades oncogênicas (KHAN & COATES, 1994).

Durante a infecção aguda, o EBV ocasiona infecção produtiva em células epiteliais da nasofaringe e glândulas salivares, seguida de infecção latente nos linfócitos B (COHEN, 2000). O produto do gene viral BZLF1, o fator de transcrição viral EB1 (indutor essencial do ciclo lítico do EBV), é um ativador de transcrição do gene da Interleucina 10 humana (IL-10). É possível que a secreção de IL-10 possa favorecer a sobrevivência de células infectadas pelo EBV, inibindo a resposta imunitária do hospedeiro e protegendo as células infectadas da lise induzida por linfócitos T citotóxicos (MAHOT et al., 2003).

1.1.3 Linfoma de Hodgkin e Interleucinas

Citocinas são substâncias secretadas por diversas células do sistema imunitário, mas principalmente por linfócitos T-auxiliares (CD4+; Th) e macrófagos ativados. Dentre suas funções destacam-se estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, bem como recrutar e ativar outras células inflamatórias, promovendo efeitos modulatórios pró e antiinflamatórios. As citocinas exercem seus efeitos após ligação com receptores específicos nas células-alvo,

sendo que a expressão de receptores para citocinas é regulada por uma variedade de sinais exógenos e endógenos. Citocinas podem exercer atividade sobre as mesmas células que as produzem (efeito autócrino), sobre células adjacentes às que as secretaram (efeito parácrino) ou sistemicamente (efeito endócrino). Alteração nos níveis de citocinas resultantes de alterações genéticas podem favorecer a transformação celular ou progressão tumoral.

Linfócitos T CD4⁺ podem produzir citocinas em perfis denominados Th1, que induz resposta imunitária mediada por células, ou Th2, que promovem resposta imunitária humoral. A Interleucina 2 (IL-2), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e o interferon- γ (IFN- γ) estimulam a produção de citocinas do perfil Th1, responsáveis pela eliminação de células neoplásicas e células infectadas por vírus. Por outro lado, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 estimulam a produção de citocinas do perfil Th2, associado a respostas humorais, mais eficientes na eliminação de bactérias extracelulares (OPAL & DEPALO, 2000).

Citocinas produzidas por células de HRS podem contribuir para a patogênese do LH, iniciando e sustentando o estabelecimento de infiltrado leucocitário reativo, além de contribuir para proliferação celular e sobrevida de células HRS (SKINNER & MAK, 2002; MAGGIO et al., 2002). Elevada expressão de citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e fator transformador do crescimento- β (TGF- β) tem sido descrito no LH. A síntese de IL-5 pelas células de HRS se correlaciona com o acúmulo de eosinófilos, observados em maior ou menor grau nos subtipos celularidade mista e esclerose nodular, respectivamente (SAMOSZUK & NANSEN, 1990). Por outro lado, alguns autores sugerem que a produção de TGF- β está restrita ao LH subtipo esclerose nodular (KADIN et al., 1990). Aldinucci et al. (2002) relataram que IL-3 pode ter papel na proliferação e aumento de sobrevida de células HRS. Adicionalmente, alguns estudos demonstraram a presença de citocinas em linhagens de células de HRS geradas a partir de tecidos biopsiados, incluindo IL-6, IL-8 (BECK et al., 2001) e IL-10 (DUKERS et al., 2000).

A IL-10 é a mais importante citocina antiinflamatória encontrada na resposta imunitária humana. É produzida por células T ativadas (perfil Th2), macrófagos e monócitos ativados, células B estimuladas e mastócitos. É um potente inibidor de citocinas do perfil Th1, incluindo IL-2 e IFN- γ . Atua também como fator de cresci-

mento para mastócitos e induz diferenciação e proliferação de linfócitos B (SKINNER & MAK, 2002); este último efeito, em particular, pode ter papel importante no desenvolvimento do LH. Bohlen et al. (2000) relataram que altos níveis de IL-10 em pacientes com LH são indicativos de pior prognóstico.

1.1.4 SNPs em genes codificadores de citocinas

Dentre as principais razões para se estudar polimorfismos nos genes de citocinas destacam-se obter melhor entendimento da etiologia e patogenia de doenças humanas, identificar marcadores potenciais de susceptibilidade e agressividade biológica, identificar marcadores potenciais para respondedores *versus* não-respondedores em ensaios clínicos, identificar alvos para intervenção terapêutica e identificar novas estratégias para prevenção (BIDWELL et al., 1999).

Defini-se como polimorfismo qualquer seqüência variante presente em uma frequência superior a 1% na população. A presença de múltiplos alelos para um dado locus é capaz de influenciar a expressão do produto de determinado gene, ou mesmo alterar sua atividade.

Dentre os polimorfismos mais estudados encontram-se os dos genes do citocromo P450, família de enzimas que participam na conversão de compostos pré-carcinogênicos em carcinogênicos, ocasionando diferenças interindividuais no metabolismo de determinada droga. Essas variações atribuídas a determinado polimorfismo dividem os indivíduos nos grupos de bons metabolizadores e maus metabolizadores. Entre as enzimas mais estudadas desse complexo estão CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 (SUNDBERG, 2001). Vogel et al. (2001) sugerem, por exemplo, que um polimorfismo no códon 156 do éxon 6 do gene XPD, cujo produto tem participação no reparo do DNA, influencia o risco de desenvolvimento de carcinoma de células basais em pacientes americanos com história familiar de câncer de pele, ainda que a função enzimática da XPD não seja afetada pela mutação.

Estudos recentes indicam a associação de polimorfismos em genes de interleucinas com o prognóstico de algumas doenças imunitárias, infecciosas e neoplásicas. Em pacientes com câncer pancreático avançado, foi demonstrado que a exis-

tência de alguns haplótipos do gene da IL-1 β (relacionados a produção aumentada da citocina pró-inflamatória IL-1 β), está associada com menor sobrevida quando comparado a outros haplótipos (BARBER et al., 2000). Moos et al. (2000) sugerem que a combinação entre determinados haplótipos de IL-1 β e TNF- α pode contribuir para o desenvolvimento da osteoartrite. Fishman et al. (1998) demonstraram que alguns polimorfismos no gene da IL-6 podem prevenir artrite reumatóide juvenil. Mira et al. (1999) descreveram que diferenças na susceptibilidade e mortalidade por choque séptico estão associados a determinados polimorfismos na região promotora de TNF- α . Por sua vez, Hahn et al. (2001) observaram que determinados haplótipos de TNF- α estão associados com episódios de rejeição aguda ao transplante renal.

Em seres humanos, o gene da IL-10 está localizado no braço longo do cromossomo 1. Na região promotora proximal do gene da IL-10 podem ser encontrados três polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP), localizados nas posições -1082 (A/G), -819 (T/C) e -592 (C/A) (SNPs/IL-10) (TURNER et al., 1997). Três haplótipos, formados por esses nucleotídeos nas respectivas posições -1082, -819, -592, têm sido descritos na população caucasiana: ATA, ACC e GCC (DONCEL et al., 2002, MYHR et al., 2002). Mok et al. (1998) encontraram um quarto haplótipo, GTA, na população chinesa. Por outro lado, alguns estudos determinaram a ocorrência de somente três haplótipos da IL-10 (GCC, ACC e ATA) por análise de heteroduplex de DNA (MORSE et al., 1999; WOOD et al., 2001).

Em relação à posição -1082 da região promotora da IL-10, tem sido descrito que os homozigotos para o alelo G estão associados à alta produção da citocina, os heterozigotos estão associados à produção intermediária e os homozigotos para A estão associados à baixa produção de IL-10 (ESKDALE et al., 1998; HUANG et al., 1999; PELLETIER et al., 2000; TAMBUR et al., 2001; DONCEL et al., 2002). Portanto, a maioria dos autores descrevem que a combinação de haplótipos GCC/GCC está associado com alta expressão de IL-10, GCC/ATA, GCC/ACC e GTA/ACC está associado com média expressão e ATA/ATA, ATA/ACC e ACC/ACC com baixa expressão. Helminen et al. (1999) descrevem que o alelo G na posição -1082 (relacionado à alta produção de IL-10) confere proteção contra infecção pelo EBV. Curiosamente, outro estudo do mesmo grupo descreveu que o haplótipo ATA (nucleotídeos nas posições -1082, -819 e -592, respectivamente) também está ligado a altos

níveis séricos de IL-10 e confere proteção contra infecção viral (HELMINEN et al., 2001). Por estarem geneticamente muito próximos uma da outra, alguns autores afirmam que alelos nas posições -819 e -592 do sítio promotor da IL-10 (ESKDALE et al., 1997) estão em completo equilíbrio de ligação, exibindo segregação em conjunto (*linkage*) (ESKDALE et al. 1999; SUAREZ et al., 2003; MYHR et al., 2003).

Recentemente, Gibson et al. (2001) descreveram a associação de novos haplótipos na região promotora distal do gene da IL-10 com os níveis de produção da citocina. Vários polimorfismos em seqüências microssatélite do gene da IL-10 (IL-10.G e IL-10.R) estão sendo estudados (KOBAYASHI et al., 1999; ZHENG et al., 2001), assim como polimorfismos nos genes que codificam receptores para a IL-10. Em estudo com pacientes japoneses publicado em 1999, Nagashima et al. (1999) concluíram que o polimorfismo no receptor de IL-10 não está significativamente associado com lupus eritematoso sistêmico (LES). Embora Tanaka et al. (1997) tenham encontrado dois tipos de polimorfismos no receptor da IL-10 em indivíduos japoneses normais, os autores concluíram que esses polimorfismos provavelmente não alteram a função do receptor porque não ocasionam substituição de aminoácidos na cadeia polipeptídica.

Outro estudo sobre polimorfismo no gene da IL-10 e do TNF- α mostrou que o genótipo associado à alta produção de TNF- α e baixa produção de IL-10 (caracterizado por A na posição -1082) era comum no grupo de pacientes com baixos índices de sucesso em transplante cardíaco (TURNER et al., 1997). Mok et al. (1998) relataram que o polimorfismo na região promotora da IL-10 não está associado de maneira convincente à susceptibilidade ao LES em pacientes chineses; entretanto, o haplótipo ATA está associado com certas manifestações clínicas da doença (e.g., comprometimento renal) e, portanto, influencia o prognóstico. Ainda com relação ao LES, Eskdale et al. (1997) encontraram correlação entre polimorfismo em microssatélites da região promotora (IL10.G e IL10.R) e o desenvolvimento da doença, enquanto Rood et al. (1999) descreveram associação do haplótipo ATA e manifestações neuropsiquiátricas. Entretanto, Linden et al. (2000) demonstraram que as frequências dos haplótipos da região promotora proximal da IL-10 não diferiram entre pacientes com LES e indivíduos controles.

Reich et al. (1999) estudaram o polimorfismo na posição -1082 da região promotora da IL-10 e verificaram associação com início do aparecimento da psoríase. Os polimorfismos do promotor da IL-10 não influenciaram o desenvolvimento do câncer cervical invasivo em mulheres coreanas (ROH et al., 2002), e Stanczuc et al. (2001) também não encontraram nenhuma associação entre determinados genótipos na posição -1082 da IL-10 e diferentes estágios de câncer de cérvix uterino em mulheres do norte de Zimbábue. Por outro lado, suspeita-se que a predisposição de produzir altos níveis de IL-10 determinada pela presença de G na posição -1082 pode ter papel relevante na transformação celular.

Alguns autores descreveram aumento na transcrição do RNA da IL-10 em células HRS de casos EBV-positivos em relação a casos EBV-negativos (HERBST et al., 1996; OHSHIMA et al., 1995). Em estudo publicado por Beck et al. (2001) foi relatado aumento da expressão de IL-10 em células HRS em casos de LH EBV-positivos. Dukers et al. (2000) descreveram maior expressão de IL-10 em LH esclerose nodular EBV-positivos em relação a casos EBV-negativos (35,2% vs 18,1%). Em trabalho publicado em 2001, foi proposto que os níveis séricos elevados de IL-10, freqüentemente observados em pacientes com LH, podem estimular a expressão de bcl-2 e, desse modo, prevenir a apoptose das células neoplásicas (VASSLAKOPOULOS et al., 2001). Nessa linha, cabe ainda salientar que, em trabalho publicado em 2000, a expressão de bcl-2 foi observada em aproximadamente 60% dos casos de LH estudados por Smolewski et al. (2000).

Estudos relatando predisposição genética ao desenvolvimento de determinadas doenças associado à presença de polimorfismos no gene da IL-10 levantam questões sobre o possível envolvimento dos SNPs/IL-10 na patogênese do LH. Em linfomas não-Hodgkin, Cunningham et al. (2003) descreveram que o genótipo AA na posição -1082 no sítio promotor do gene da IL-10, que está relacionado a baixa produção da citocina, pode influenciar susceptibilidade a formas agressivas da doença ou mesmo contribuir em sua patogênese. No LH, recente trabalho sobre SNPs/IL-10 não encontrou relação entre os diferentes genótipos nas posições -1082 e -592 e os diferentes subtipos da doença, muito embora a citocina seja detectada em altos níveis no soro dos pacientes (MUNRO et al., 2003).

O estudo da frequência dos SNPs conhecidos nas posições -1082, -819 e -592 da região promotora do gene que codifica IL-10 pode fornecer informações que permitem classificar pacientes com LH de acordo com os genótipos dos SNPs/IL-10 e sua eventual associação com parâmetros selecionados, como tipo histológico e estadio da doença, faixa etária do paciente e presença de infecção pelo EBV.

1.2 Referências Bibliográficas*

ALDINUCCI, D.; POLETTO, D.; GLOGHINI, A.; NANNI, P.; DEGAN, M.; PERIN, T.; CEOLIN, P.; ROSSI, F.M.; GATTEI, V.; CARBONE, A.; PINTO, A. Expression of functional interleukin-3 receptors on Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Am. J. Pathol.**, v.160, p.585-596, 2002.

ARMSTRONG, A.A.; ALEXANDER, F.E.; PAES, R.P.; MORAD, N.A.; GALLAGHER, A.; KRAJEWSKI, A.S.; JONES, D.B.; ANGUS, B.; ADAMS, J.; CARTWRIGHT, R.A.; ONIONS, D.E.; JARRETT, R.F. Association of Epstein-Barr virus with pediatric Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v.142, p.1683-1688, 1993.

BARBER, M.D.; POWELL, J.J.; LYNCH, S.F.; FEARON, K.C.H.; ROSS, J.A. A polymorphism of the interleukin-1 β gene influences survival in pancreatic cancer. **Br. J. Cancer**, v.83, p.1443-1447, 2000.

BECK, A.; PAZOLT, D.; GRABENBAUER, G.G.; NICHOLLS, J.M.; HERST, H.; YOUNG, L.S.; NIEDOBITEK, G. Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. **J. Pathol.**, v.194, p.145-151, 2001.

BIDWELL, J.; KEEN, L.; GALLANGHER, G.; KIMBERLY, R.; HUIZINGA, T.; MCDERMOTT, M. F.; OKSENBERG, J.; MCNICHOLL, J.; POCIOT, F.; HARDT, C., DALFONSO, S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes Immun.**, v.1, p.3-19, 1999.

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. **Ann. Hematol.**, v.79, p.110-113, 2000.

BRAUNINGER, A.; WACKER, HH.; RAJEWSKY, K.; KUPERS, R.; HANSMANN, M-L. Typing the histogenetic origin of the tumor cells of lymphocyte-rich classical Hodg-

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 1997. 240p.

kin's lymphoma in relation to tumor cells of classical and lymphocyte-predominance Hodgkin's lymphoma. **Cancer Res.**, v.63, p.1644-1651, 2003.

CARBONE, A.; DOLCETTI, R.; GLOGHINI, A.; GLOGHINI, A.; MAESTRO, R.; VACCHER, E.; LUCA, D.D.; TIRELLI, U.; BOIOCCHI, M. Immunophenotypic and molecular analyses of acquired immune deficiency syndrome-related and Epstein-Barr virus-associated lymphomas: A comparative study. **Hum. Pathol.**, v.27, p.133-146, 1996.

CHANG, K.L.; ALBUJAR, P.F.; CHEN, Y.Y.; JOHNSON, R.M.; WEISS, L.M. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. **Blood**, v.81, p.496-501, 1993.

COHEN, J.I. Epstein-Barr virus infection. **N. Engl. J. Med.**, v.343, p.481-492, 2000.

CUNNINGHAM, L. M.; CHAPMAN, C.; DUNSTAN, R.; BELL, M. C.; JOSKE, D. J. L. Polymorphisms in the Interleukin 10 gene promoter are associated with susceptibility to aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**, v.44, p.251-255, 2003.

DIEHL, V.; THOMAS, R.K.; RE, D. Part II: Hodgkin's lymphoma – diagnosis and treatment. **Lancet**, v.5, p.19-26, 2004.

DOLCETTI, R.; BOIOCCHI, M. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. **Biomed. Pharmacother.**, v.52, p.13-25, 1998.

DONCEL, A.M.; RUBIO, A.; ARROYO, R.; DE LAS HERAS, V.; MARTIN, C.; ARQUERO, M.F.; DE LA CONCHA, E.M. Interleukin-10 polymorphism in Spanish Multiple Sclerosis patients. **J. Neuroimmunol.**, v.131, p.168-172, 2002.

DUKERS, D.F.; JASPARS, L.H.; VOS, W.; OUDEJANS, J.J.; HAYES, D.; CILLESSEN, S.; MIDDELDORP, J.M.; MEIJER, C.J.L.M. Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles in Epstein-Barr virus-positive and -negative cases of Hodgkin's disease. **J. Pathol.**, v. 190, p.143-149, 2000.

EKSTRAND, B.C.; HORNING, S.J. Hodgkin's disease. **Blood Rev.**, v.16, p.111-117, 2002.

ELGUI DE OLIVEIRA, D.; BACCHI, M. M.; ABREU, E. S.; NIERO-MELO, L.; BACCHI, C.E. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.118, p.25-30, 2002.

ESKDALE, J.; GALLGHER, G.; VERWEIJ, C.L.; KEIJSERS, V.; WESTENDORP, R.G.J.; HUIZINGA, T.W.J. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.9465-9470, 1998.

ESKDALE, J.; KEIJSERS, V.; HUIZINGA, T.; GALLAGHER, G. Microsatellite Alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. **Genes Immun.**, v.1, p.151-155, 1999.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; TESCH, H.; GALLAGHER, G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, v. 46, p.120-128, 1997.

ESKDALE, J.; WORDSWORTH, P.; BOWMAN, S.; GALLAGHER, F.G. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, v.49, p.635-639, 1997.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFERRY, R.; MOHAMED-ALI, V.; YUDKIN, J.S.; HUMPRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis. **J. Clin. Invest.**, v.102, p.1369-1376, 1998.

FLAVELL, K.J.; BILLINGHAM, L.J.; BIDDULPH, J.P.; GRAY, L.; FLAVELL, J.R.; CONSTADINOU, C.M.; YOUNG, L.S.; MURRAY, P.G. The effect of Epstein-Barr virus status on outcome in age- and sex-defined subgroups of patients with advanced Hodgkin's disease. **Ann. Oncol.**, v.14, p.282-290, 2003.

FLAVELL, K.J.; MURRAY, P.G. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. **Mol. Pathol.**, v.53, p.262-269, 2000.

GALLAGHER, A.; PERRY, J.; FREELAND, J.; ALEXANDER, F.E.; CARMAN, W.F.; SHIELD, L.; CARTWRIGHT, R.; JARRET, R.F. Hodgkin Lymphoma and Epstein-Barr Virus (EBV): No evidence to support hit-and-run mechanism in cases classified as non-EBV-associated. **Int. J. Cancer**, v.104, p.624-630, 2003.

GALLAGHER, A.; PERRY, J.; SHIELD, L.; FREELAND, J.; MACKENZIE, J.; JARRET, R.F. Viruses and Hodgkin disease: no evidence of novel herpesviruses in non-EBV-associated lesions. **Int. J. Cancer**, v.101, p.259-264, 2002.

GAN, Y.J.; RAZZOUK, B.I.; SU, T.; SIXBEY, J.W. A defective, rearranged Epstein-Barr Virus genome in EBER-negative and EBER-positive Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v.160, p.781-786, 2002.

GIBSON, A.W.; EDBERG, J.C.; WU, J.; WESTENDORP, R.G.J.; HUIZINGA, T.W.J.; KIMBERLY, R.P. Novel single nucleotide polymorphism in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, v.166, p.3915-3922, 2001.

GLASER, S.L.; LIN, R.J.; STEWART, S.L.; AMBINDER, R.F.; JARRET, R.F.; BROUSSET, P.; PALLESEN, G.; GULLEY, M.; KHAN, G.; O'GRAND, J.; HUMMEL, M.; PRECIADO, M.V.; KNECHT, H.; CHAN, J.K.C.C.; CLAVIEZ, A. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. **Int. J. Cancer**, v.70, p.375-382, 1997.

GLASER, S.L.; SWART, W.G. Time trends in Hodgkin's disease incidence. The role of diagnostic accuracy. **Cancer**, v.66, p.2196-2204, 1990.

HAHN, A.B.; KASTEN-JOLLY, J.C.; CONSTANTINO, D.M.; GRAFFUNDER, E.; SINGH, T.P.; SHEN, G.K.; CONTI, D.J. TNF- α , IL-6, IFN- γ , and IL-10 gene expression polymorphism and the IL-4 receptor α -chain variant Q576R: effects on renal allograft outcome. **Transplantation**, v.72, p.660-665, 2001.

HALUSKA, F.; BRUFSKY, A. M.; CANELLOS, G. P. The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. **Blood**, v. 84, p.1005-1019, 1994.

HELMINEN, M.E.; LAHDENPOHJA, N.; HURME, M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. **J. Infect. Dis.**, v.180, p.496-499, 1999.

HELMINEN, M.E.; KILPINEN, S.; VIRTA, M.; HURME, M. Susceptibility to primary Epstein-Barr Virus infection is associated with Interleukin-10 gene promoter polymorphism. **J. Infect. Dis.**, v.184, p.777-780, 2001.

HERBST, H.; FOSS, H.D.; SAMOL, J.; ARAUJO, I.; KLOTZBACH, H.; KRAUSE, H.; AGATHANGGELOU, A.; NIEDOBITEK, G.; STEIN, H. Frequent expression of interleukin-10 Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. **Blood**, v.87, p.2918-2929, 1996.

HERBST, H.; NIEDOBITEK, G.; KNEBA, M.; HUMMEL, M.; FINN, T.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; BERGHOLZ, M.; KRIEGER, G.; STEIN, H. High incidence of Epstein-Barr virus genomes in Hodgkin's disease. **Am. J. Pathol.**, v.137, p.13-18, 1990.

HODGKIN, T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. **Med. Chir. Trans.**, v.17, p.69-114, 1832.

HUANG, D.; ZHOU, Y.; XIA, S.; LIU, L.; PIRSKANEN, R.; LEFVERT, A. K. Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL-10) gene in myasthenia gravis: implications of diverse effects of IL-10 in the pathogenesis of the disease. **J. Neuroimmunol.**, v.94, p.82-87, 1999.

INGHIRAMI, G.; MACRI, L.; ROSATI, S.; ZHU, B.Y.; YEE, H.T.; KNOWLES, D.M. The Reed-Sternberg cells of Hodgkin disease are clonal. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.91, p.9842-9846, 1994.

JARRET, R.F. Viruses and Hodgkin's lymphoma. **Ann. Oncol.**, v. 13, p.23-29, 2002.

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

KHAN, G.; COATES, P.J. The role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. **J. Pathol.**, v.174, p.141-149, 1994.

KOBAYASHI, T.; YOKOYAMA, I.; HAYASHI, S.; NEGITA, M.; NAMII, Y.; NAGASAKA, T.; OGAWA, H.; HABA, T.; TOMINAGA, Y.; UCHIDA, K.; TAKAGI, H. Genetic polymorphism in the IL-10 promoter region in renal transplantation. **Transplantation Proc.**, v.31, p.755-756, 1999.

KRUGMANN, J.; TZANKOV, A.; GSCHWENDTNER, A.; FISCHHOFER, M.; GREIL, R.; FEND, F.; DIRNHOFER, S. Longer failure-free survival interval of Epstein-Barr virus-associated classical Hodgkin's lymphoma: a single-institution study. **Mod. Pathol.**, v.16, p.566-573, 2003.

KUPPERS, R.; RAJEWSKY, K. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. **Annu. Rev. Immunol.**, v.16, p.471-493, 1998.

LINDEN, M.W.V.D.; WESTENDORP, R.G.J.; STURK, A.; BERGMAN, W.; HUIZINGA, W.J. High interleukin-10 production in first-degree relatives of patients with generalized but not cutaneous lupus erythematosus. **J. Invest. Med.**, v.48, p.327-334, 2000.

MAGGIO, E.; VAN DER BERG, A.; DIEPSTRA, A.; KLUIVER, J.; VISSER, L.; POPPEMA, S. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. **Ann. Oncol.**, v.13, p.52-56, 2002.

MAHOT, S.; SERGEANT, A.; DROUET, E.; GRUFFAT, H. A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. **J. Gen. Virol**, v.84, p.965-974, 2003.

MCKINNEY, P.A.; ALEXANDER, F.E.; RICKETTS T.J.; WILLIAMS, J. A specialist leukaemia/lymphoma registry in the UK. Part 1: Incidence and geographical distribution of Hodgkin's disease. **Br. J. Cancer**, v.60, p.942-947, 1989.

MCCMAHON, B. Epidemiology of Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, v.26, p.1189-1200, 1966.

MIRA, J.P.; CARIOU, A.; GRALL, F.; DELCLAUX, C.; LOSSER, M.R.; HESHMATI, F.; CHEVAL, C.; MONCHI, M.; TEBOUL, J.L.; RICHE, F.; LELEU, G.; ARBIBE, L.; MIGNON, A.; DELPECH, M.; DHAINAUT, J.F. Association of TNF2, a TNF-a promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. **JAMA**, v.282, p.561-568, 1999.

MOK, C.C.; LANCHBURY, J.S.; CHAN, D.W.; LAU, C.S. Interleukin-10 promoter polymorphism in southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v.41, p.1090-1095, 1998.

MOOS, V.; RUDWALEIT, M.; HERZOG, V.; HOHLIG, K.; SIEPER, J.; MULLER, B. Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1 β or Interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. **Arthritis Rheum.**, v.43, p.2417-2422, 2000.

MORSE, H, R.; OLOMOLAIYE, O. O.; WOOD, N. A. P.; KEEN, L. J.; BIDWELL, J. L. Induced heteroduplex genotyping of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 polymorphism associated with transcriptional regulation. **Cytokine**, v.11, p.789-795, 1999.

MUNRO, L. R.; JOHNSTON, P. W.; MARSHALL, S. J.; CANNING, S. G.; HEWITT, K.; TVEITA, K.; VICKERS, M. A. Polymorphisms in the Interleukin-10 and interferon gamma genes in Hodgkin Lymphoma. **Leuk. Lymphoma**, v. 44, p.2083-2088, 2003.

MYHR, K.M.; VAGNES, K.S.; MAROY, T.H.; AARSETH, J.H.; NYLAND, H.I.; VEDELER, C. A. Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with multiple sclerosis. **J. Neurolog. Sci.**, v.202, p.93-97, 2002.

MYHR, K.M.; VAGNES, K. S.; MAROY, T. H.; AARSETH, J. H.; NYLAND, H. I.; VEDELER, C. A. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with Guillain-Barré syndrome. **J. Neuroimmunol.**, v.139, p.81-83, 2003.

NAGASHIMA, H.; AKAHOSHI, M.; TANAKA, Y.; YAMAOKA, K.; OGAMI, E.; NAGANO, S.; ARINOBU, Y.; NIRO, H.; OTSUKA, T.; NIHO, Y. Polymorphism within the interleukin-10 receptor cDNA gene (IL-10) in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v.38, p.1142-1144, 1999.

OHSHIMA, K.; SUZUMIYA, J.; AKAMATU, M.; TAKESHITA, M.; KIKUCHI, M. Human and viral interleukin-10 in Hodgkin's disease, and its influence on CD4+ and CD8+ T lymphocytes. **Int. J. Cancer.**, v.62, p.5-10, 1995.

OPAL, S.M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v.117, p.1162-1172, 2000.

PAPADAKI, T.; STAMATOPOULOS, K. Hodgkin disease immunopathogenesis: long-standing questions, recent answers, further directions. **Immunology**, v.24, p.508-511, 2003.

PELLETIER, R.; PRAVICA, V.; PERREY C.; XIA, D.; FERGUSON, R.M.; HUTCHINSON; OROSZ, C. Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. **Transplantation**, v.70, p.674-680, 2000.

PURTILO, D.T.; STROBACH, R.S.; OKANO, M.; DAVIS, J.R. Biology of Disease: Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. **Lab. Invest.**, v.67, p.5-23, 1992.

REICH, K.; WESTPHAL, G.; SCHULZ, T.; MULLER, M.; ZIPPRICH, S.; FUCHS, T.; HALLIER, E.; NEUMANN, C. Combined analysis of polymorphism of the tumor re-

croisis factor-a and interleukin-10 promoter regions and polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes in psoriasis. **J. Invest. Dermatol.**, v.113, p.214-220, 1999.

ROH, J.W.; KIM, M.H.; SEO, S.S.; KIM, S.H.; KIM, J.W.; PARK, N.H.; SONG, Y.S.; PAR, S.Y.; KANG, S.B.; LEE, H.P. Interleukin-10 promoter polymorphism and cervical cancer risk in Korean women. **Cancer Lett.**, v.184, p.57-63, 2002.

ROOD, M.J.; KEIJSERS, V.; VAN DER LINDEN, M.W.; TONG, T.Q.T.; BORGGREVE, S.E.; VERWEIJ, C.L.; BREEDVELD, F.C.; HUIZINGA, T.W.J. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus is associated with imbalance in interleukin 10 promoter haplotypes. **Ann. Rheum. Dis.**, v.58, p.85-89, 1999.

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

SKINNIDER, B.F.; MAK, T.W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.99, p.4283-4297, 2002.

SMOLEWSKI, P.; ROBAK, T.; KRVKOWSKI, E.; MORAWIEC, M.B.; NIEWIADOMSKA, H.; PLUZANSKA, A.; CHMIELOWSKA, E.; ZAMBRANO, O. Prognostic factors in Hodgkin's disease : multivariate analysis of 327 patients from a single institution. **Clin. Cancer Res.**, v.6,p.1150-1160, 2000.

STANCZUK, G.A.; SIBANDA, E.N.; PERREY, C.; CHIRARA, M.; PRAVICA, V.; HUTCHINSON, I.V.; TSWANA, S.A. Cancer of the uterine cervix may be significantly associated with a gene polymorphism coding for increased IL-10 production. **Int. J. Cancer.**, v.94, p.792-794, 2001.

SUAREZ, A.; CASTRO, P.; ALONSO, R.; MOZO, L.; GUTIERREZ, C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. **Transplantation**, v.75, p.711-717, 2003.

SUNDBERG, M.I. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants: The role of the CYP family of enzymes. **Mutat. Res.**, v.482, p.11-19, 2001.

TAMBUR, A.R.; ORTEGEL, J.W.; BEM-ARI, Z.; SHABTAI, E.; KLEIN, T.; MICHOWIZ, R.; TUR-KASPA, R.; MOR, E. Role of cytokine gene polymorphism in

hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. **Transplantation**, v.71, p.1475-1480, 2001.

TANAKA, Y.; NAKASHIMA, H.; OTSUKA, T.; NEMOTO, Y.; NIRO, H.; YAMAOKA, K.; OGAMI, E.I.; ARINOBU, Y.; TACHIDA, H.; IMAMURA, T.; NIHO, Y. Detection of polymorphisms within the human IL-10 receptor cDNA gene sequence by RT-RFLP. **Immunogenetics**, v.46, p.439-441, 1997.

THOMAS, R.K.; RE, D.; WOLF, J.; DIEHL, V. Part 1: Hodgkin's lymphoma – molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. **Lancet**, v.5, p.11-18, 2004.

THOMAS, R.K.; RE, D.; ZANDER, T.; WOLF, J.; DIEHL, V. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. **Ann. Oncol.**, v.13, p.147-152, 2002.

THOMPSON, M. P.; KURZROCK, R. Epstein-Barr virus and Cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.10, p.803-821, 2004.

TURNER, D.; GRANT, S.C.D.; YONAN, N.; SHELDON, S.; DYER, P.A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. **Transplantation**, v.64, p.776-779, 1997.

TURNER, D.M.; WILLIAMS, D.M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur. J. Immunogenet.**, v.24, p.1-8, 1997.

VASSLAKOPOULOS, T.P.; NADALI, G.; ANGELOPOULOU, M.K.; SIAKANTARIS, M.P.; DIMOPOULOU, M.N.; KONTOPIDOU, F.N.; RASSIDAKIS, G.Z.; ANAGNOSTOPOULOU, I.A.D.; HATZIOANNOU, M.; VAIOPOULOS, G.; KITTAS, C.; SARRIS, A.H.; PIZZOLO, G.; PANGALIS, G.A. Serum interleukin-10 levels are an independent prognostic factor for patients with Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, v.86, p.274-281, 2001.

VOGEL, U.; HEDAYATI, M.; DYBDAHL, M.; GROSSMAN, L.; NEXO, B.A. Polymorphism of the DNA repair gene XPD: correlations with risk of basal cell carcinoma revisited. **Carcinogenesis**, v.22, p.899-904, 2001.

WEISS, L.M.; CHEN, Y.Y.; LIU, X-F.; SHIBATA, D. Epstein-Barr Virus and Hodgkin's Disease: A correlative In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction study. **Am. J. Pathol.**, v.139, p.1259-1265, 1991.

WOOD, N. A. P.; KEEN, L. J.; TILLEY, L. A.; BIDWELL, J. L. Determination of cytokine regulatory haplotypes by induced heteroduplex analysis of DNA. **J. Immunol. Methods**, v. 249, p.191-198, 2001.

YOUNG, L.S.; MURRAY, P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumor. **Oncogene**, v.22, p.5108-5121, 2003.

YUNG, L., LINCH, D. Hodgkin's lymphoma. **Lancet**, v.361, p.943-951, 2003.

ZHENG, C.; HUANG, D.; LIU, L.; WU, R.; BERGENBRANT, G.; OSTERBORG, A.; BJORKHOLM, M.; HOLM, G.; YI, Q.; SUNDBLAD, A. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in multiple myeloma. **Int. J. Cancer**, v.95, p.184-188, 2001.

2 Capítulo 2

2.1 Manuscrito

(De acordo com as normas da revista British Journal of Haematology)

Avaliação de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) na região promotora do gene da Interleucina 10 em pacientes com Linfoma de Hodgkin

Glenda Nicioli da Silva¹, Deilson Elgui de Oliveira¹, Maura Moscardi Bacchi¹

1 Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu,
SP, Brasil

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Maura Moscardi Bacchi

Consultoria em Patologia (Rua Major Leônidas Cardoso, 739)

Botucatu, CEP: 18602-010

Running title: Polimorfismo de IL-10 em Linfoma de Hodgkin

Agradecimentos

Este estudo obteve auxílio financeiro da Fapesp Processo: nº 2002/04487-7 e nº 2000/13320-3.

2.1.1 *Resumo*

O linfoma de Hodgkin (LH) tem características clínicas e anátomo-patológicas distintas dos linfomas não-Hodgkin. Seu componente neoplásico, as células de Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS), corresponde a cerca de 2% do tumor. As células H-RS apresentam imunofenótipo peculiar e sua origem ainda é objeto de estudo. O LH é classificado em LH clássico (que inclui os subtipos celularidade mista, esclerose nodular, depleção linfocítica e LH rico em linfócitos) e LH predominância linfocítica nodular. A associação do vírus de Epstein-Barr (EBV) com LH é conhecida e acredita-se que este vírus desempenha importante papel no desenvolvimento de parcela significativa dos casos de LH. No LH, o acúmulo de células reativas como linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, histiócitos e fibroblastos ocorre em resposta a citocinas secretadas pelas células H-RS. A interleucina 10 (IL-10), importante citocina antiinflamatória da resposta imunitária, tem sido encontrada em grande quantidade em indivíduos com LH. É possível que essa elevada expressão de IL-10 esteja vinculada a determinados polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP) na seqüência promotora do gene da IL-10, que podem se associar a características anátomo-clínicas do LH. O presente trabalho avaliou a freqüência dos polimorfismos da IL-10 nas posições promotoras -1082, -819/-592 e estudou a correlação destes polimorfismos em LH com subtipos histológicos, infecção pelo EBV, faixa etária e, em alguns casos, estadiamento clínico da doença. Os resultados demonstram que os diferentes fenótipos para produção de IL-10, genótipos na posição -1082 e genótipos nas posições -592/-819 não têm relação com subtipos do LH e idade dos pacientes. Por outro lado, verificou-se que o genótipo GG na posição -1082 e a combinação de haplótipos GCC/GCC para alta produção de IL-10 são mais freqüentes em casos de LH EBV-positivos. O presente trabalho verificou aumento na freqüência do genótipo GG na posição -1082 da seqüência promotora do gene da IL-10 em casos de LH EBV-positivos em relação aos casos de EBV-negativos. Esses resultados levantam a hipótese de que o desenvolvimento do LH EBV-positivo pode estar relacionado a certo grau de susceptibilidade genética definida pela presença de determinados SNPs/IL-10, notadamente os associados ao fenótipo de alta produção de IL-10.

Palavras-chaves: Linfoma de Hodgkin, Epstein-Barr virus (EBV), Interleucina 10 (IL-10), polimorfismos, células de Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS).

2.1.2 Summary

Clinical and pathologic features of Hodgkin's lymphoma (HL) reflect an abnormal immune response, which is in part due to the elaboration of a variety of cytokines. It was reported that interleukin 10 (IL-10), which may be produced by the malignant Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS) cells, is an important prognostic factor in HL, and it could play a role in the pathogenesis of this neoplasm. It is well established that genetic factors affect protein expression and function. In this regard, polymorphisms in the promoter region of IL-10 gene may cause different phenotypes for IL-10 synthesis and activity. Three dimorphic single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified at positions -1082, -819 and -519 within the IL-10 promoter region (SNPs/IL-10). These polymorphisms are in close proximity to several transcription factors binding-sites, and may interfere with IL-10 gene transcription. The aim of this study was to evaluate whether there is a particular distribution of SNPs at positions -1082, -819 and -519 in the IL-10 gene promoter in patients with HL, as well as to access the differences in the SNPs/IL10 frequency regarding HL subtype, patient age, EBV infection status, and clinical staging of the disease. For these purposes, sixty-five cases of HL and fifty cases of reactive follicular lymphoid hyperplasia (RFLH) were evaluated for SNPs/IL-10 by polymerase chain reaction amplification plus restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP). Compared to HL EBV-negative cases, in HL EBV-positive cases it was observed a significant increase in the frequency of GG genotype at position -1082 of IL-10 gene promoter region, which is associated to high level of IL-10 production. No differences were observed in the frequency of different SNPs/IL-10 concerning patient age, HL subtype, and clinical stage of the disease. These results suggests the development of EBV-positive HL may be associated to some degree of genetic susceptibility due the presence of specific SNPs at IL-10 gene promoter region, notably those associated to high level of IL-10 production.

Key-Words: Hodgkin lymphoma, Epstein-Barr virus (EBV), Interleukin-10 (IL-10), polymorphisms, Hodgkin/Reed-Sternberg cells (H-RS).

2.1.3 Introdução

No linfoma de Hodgkin (LH) as células de Hodgkin/Reed-Sternberg (H-RS) constituem apenas 2% do tumor, formado predominantemente por um infiltrado heterogêneo de células inflamatórias não-neoplásicas (Hodgkin *et al*, 1832; Haluska *et al*, 1994; Flavell & Murray, 2000). Atualmente, o LH é classificado em linfoma de Hodgkin clássico e LH predominância linfocítica nodular, sendo a primeira forma subdividida em LH subtipo esclerose nodular, LH subtipo celularidade mista, LH subtipo depleção linfocítica e LH subtipo rico em linfócitos (Yung & Linch, 2003).

O vírus de Epstein-Barr é detectado em pelo menos metade dos casos de LH, exibindo forte associação com casos de LH celularidade mista (Weiss *et al*, 1991). Armstrong *et al* (1993) sugerem que o EBV desempenha papel importante na patogênese do LH pediátrico, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Por outro lado, Khan & Coates (1994) relatam que a frequência de casos de LH EBV-positivos apresenta considerável variação sócio-geográfica: infecção pelo vírus é encontrada em 40-60% de casos de LH em pacientes imunocompetentes no Ocidente, e em até 95% dos casos de LH nos países em desenvolvimento. A fim de entender melhor a patogenia dos casos de LH EBV-negativos, alguns autores investigaram a participação de outros agentes infecciosos, mas nenhum foi identificado até o momento (Jarret, 2000; Gallagher *et al*, 2002).

Um aspecto importante da patogênese do LH é a resposta imunitária alterada, que repercute nas características clínicas e anátomopatológicas da doença. Algumas citocinas produzidas pelas células de H-RS iniciam e sustentam o infiltrado inflamatório reativo e contribui para a manutenção da neoplasia, estimulando a proliferação celular e a sobrevivência das células de H-RS (Skinnider & Mak, 2002; Maggio *et al*, 2002). A Interleucina 10 (IL-10), uma citocina que ocasiona supressão da resposta imunitária do tipo celular (perfil Th1), tem sido encontrada em níveis elevados em indivíduos com LH e parece estar associada a casos de pior prognóstico (Bohlen *et al*, 2000). A IL-10 é produzida por linfócitos T no perfil Th2, macrófagos e monócitos ativados, células B estimuladas e mastócitos. Atua também como fator de crescimento para mastócitos e induz diferenciação e proliferação de linfócitos B (Skinnider & Mak, 2002), o que pode ser elemento importante no desenvolvimento do LH.

Estudos recentes indicam que polimorfismos em genes de interleucinas podem estar associados ao prognóstico de diferentes doenças (Mira *et al*, 1999; Barber *et al*, 2000; Moos *et al*, 2000). Na região promotora da Interleucina 10, três polimorfismos de base única (SNP) podem ser encontrados, localizados nas posições -1082 (A/G), -819(T/C) e -592(C/A) (Turner *et al*, 1997). Até o momento, três haplótipos comuns têm sido descritos: GCC, ATA e ACC (Doncel *et al*, 2002), e Mok *et al* (1998) descrevem a presença do haplótipo GTA na população chinesa.

Sugeriu-se que, em relação aos SNPs, a posição -1082 do sítio promotor da IL-10 é a responsável pela diferença nos níveis de produção de IL-10, tendo sido descrito que os homozigotos para o alelo G estão associados à alta produção da citocina, enquanto heterozigotos apresentam produção intermediária e os homozigotos para o alelo A exibem baixa produção de IL-10 (Pelletier *et al*, 2000; Tambur *et al*, 2001). Essa hipótese é favorecida pelo trabalho de Helminen *et al* (1999) que relatam que o genótipo GG na posição -1082 está associado com alta produção de IL-10. Entretanto, outro trabalho desse mesmo grupo sugere que o haplótipo ATA (A na posição -1082) também está associado com altos níveis de IL-10 e oferece ainda resistência contra a infecção pelo EBV (Helminen *et al*, 2001). Entretanto, a maioria dos autores relataram que a combinação GCC/GCC está associada com elevada expressão de IL-10, ATA/ATA, ATA/ACC e ACC/ACC estão associados a baixa expressão e GCC/ATA, GCC/ACC e GTA/ACC estão associados expressão de IL-10 em níveis intermediários.

Em estudo recentemente publicado na literatura, não foi verificada relação entre os SNPs nas posições -1082 e -592 na região promotora da IL-10 e os subtipos avaliados de LH (Munro *et al*, 2003). Essa questão foi também avaliada no presente trabalho, que procurou pelas possíveis associações entre SNPs nas posições -1082, -819 e -592 na região promotora do gene da IL-10 e faixa etária, presença de infecção pelo EBV e estadiamento do LH.

2.1.4 *Materiais e Métodos*

2.1.4.1 Caracterização da casuística: A casuística foi constituída por casos de LH (celularidade mista, esclerose nodular e predominância linfocítica nodular) e casos de hiperplasia linfóide folicular reacional (HLFR), utilizados como grupo controle da distribuição dos genótipos SNP/IL-10 na população avaliada. De acordo com a faixa etária, os casos de LH foram classificados em LH pediátrico (idade igual ou menor do que 18 anos) e LH adulto (idade superior a 18 anos). Foram avaliadas amostras de tecido de 65 casos de LH e 50 casos de HLFR, obtidas dos arquivos de patologia cirúrgica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP e do laboratório Consultoria em Patologia, ambos situados em Botucatu. Para 25/65 (38,5%) dos casos de LH avaliados foram obtidos dados clínicos que permitiram estadiamento da doença. A partir dos tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, foram realizados cortes histológicos para análise histopatológica em coloração pela hematoxilina-eosina e para hibridação *in situ* para pesquisa do vírus de Epstein-Barr. Cortes adicionais foram obtidos para extração de DNA submetido a avaliação dos SNPs por PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição). Este estudo obteve avaliação favorável do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

2.1.4.2 Extração de DNA: Três cortes de 25 µm foram obtidos de cada bloco de parafina e colocados em tubos de microcentrífuga estéreis. Depois da desparafinação com xileno e hidratação em etanol, os tecidos foram digeridos *overnight* a 56°C em solução TET (Tris 10mM / EDTA 1mM / Tween 20 5%) contendo 400ng/µL de proteinase K, inativada posteriormente por incubação das amostras a 95°C por 10 min. O DNA extraído foi purificado por tratamento com NaCl 5mM, CTAB (NaCl 0.87M CTAB 0.34M) e clorofórmio:álcool isoamílico. O DNA foi precipitado, ressuspendido em solução TE (Tris-Cl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM) e mantido a -20°C até sua utilização nos ensaios de PCR-RFLP.

2.1.4.3 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) e Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP). Os ensaios de PCR foram realizados em termocicla-

dor Eppendorf Mastercycler Gradient. As reações utilizadas para avaliação de SNPs nas três posições na região promotora da IL-10 foram compostas de solução tampão (Tris-Cl 20mM pH 8,4 / KCl 50mM), MgCl₂ 3,0mM, dNTP 0,2mM, 1,0U de Taq DNA polimerase, 0,4μM de cada iniciador e concentração final de, no máximo, 8ng/μl do DNA da amostra. A amplificação foi realizada em 94°C – 5' (1 ciclo); 94°C – 1', 55°C – 1', 72°C – 1' (40 ciclos); 72°C – 7' (1 ciclo). O produto da PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 2%, corado pelo brometo de etídio. Os iniciadores utilizados e o tamanho dos amplicons esperados são apresentados na Tabela I.

Após amplificação, o produto da PCR foi digerido com enzimas de restrição, e o resultado foi avaliado em diferentes condições de acordo com a posição estudada da região promotora da IL-10: para a posição -1082, gel de acrilamida 14% e eletroforese sob diferença de potencial de 120V e tempo de corrida de 4h; para a posição -592, gel de 7% sob diferença de potencial de 120V e tempo de corrida de 2h30. Os fragmentos obtidos pela digestão são mostrados na Tabela II. A digestão do produto de PCR foi realizada *overnight* com 0,67 U/μL de enzima em solução-tampão contendo 5mM de NaCl, 1mM de Tris-HCl, 1mM de MgCl₂, 1mM de dithiothreitol (pH7,9). O equilíbrio de ligação relatado na literatura entre as posições -592 e -819 (Eskdale *et al*, 1999; Suarez *et al*, 2003; Myhr *et al*, 2003) também foi verificado após avaliação de 10% da casuística, razão pela qual se optou por suprimir do trabalho a avaliação da região -819 pela digestão do produto de PCR com a enzima Msl-1.

Tabela I – Tamanho dos amplicons e iniciadores para amplificação de segmentos do gene da IL-10 humana contendo as posições-alvos.

ALVO	INICIADORES	AMPLICON
-1082	Mok2S – 5'-ATCCAAGACAACACTACTAA-3'* Mok2A – 5'-GTGGAAGAAGTTGAAATAAC-3'*	130 pb
-819	pIL-10.SN – 5'-ATCCAAGGTTTCATTCTAT-3' pIL-10.2A – 5'-ACCCCTACCGTCTCTATTT-3'	146 pb
-592	pIL-10.1S - 5'-GAAGAGGTGGAACATGTG-3' Mok.1A – 5'-TAAATATCCTCAAAGTTCC-3'*	146 pb

*Iniciadores obtidos na literatura (Mok *et al*, 1998)

Tabela II - Enzimas de restrição dos sítios-alvos e os respectivos fragmentos gerados.

<i>Alvo</i>	<i>Enzima de restrição e sítio de clivagem</i>	<i>Resultado</i>
-1082	<i>Mnl I</i> (CCTC7/7)	A: 47, 33, 12, 38 pb G: 24, 23, 33, 12, 38 pb
- 819	<i>Msl I</i> (CAYNN↓NNRTG)	C: 103, 43 pb T: 146 pb
- 592	<i>Rsa I</i> (GT↓AC)	A: 81 e 65 pb C: 146 pb

Os géis de poliacrilamida foram produzidos com solução acril-bisacrilamida 30%, água ultrapura estéril, solução TBE 10x (Tris 1M / Ácido Bórico 0,9M / EDTA 0,01M), persulfato de amônio 10% e TEMED. A revelação foi realizada pelo método de impregnação pela prata: o gel foi fixado com solução de etanol:ácido acético (10% e 0,75%, respectivamente) por 5 minutos, tratado com solução de nitrato de prata 0,2% por 15 minutos e em seguida lavado duas vezes em água destilada por 45 segundos. A revelação das bandas ocorreu após tratamento do gel com solução de NaOH 9% e formaldeído 0,3% até o aparecimento das bandas. Por fim, o gel foi tratado novamente com solução de fixação por 5 minutos.

2.1.4.4 Pesquisa do EBV: Hibridação *in situ* não-isotópica foi realizada para pesquisa do EBV em casos de linfoma de Hodgkin. Para detecção do vírus foi empregada sonda biotinilada complementar ao gene EBER-1, que codifica RNA viral transcrito em altas taxas e células latentemente infectadas pelo EBV (10^7 cópias por núcleo). Cortes foram colocados sobre lâminas de vidro, sendo posteriormente desparafinados em xileno e hidratados em etanol. O bloqueio da peroxidase endógena deu-se por meio de incubação dos tecidos com solução de H_2O_2 3%. Seguiu-se digestão enzimática com proteinase K, que foi interrompida com solução de glicina. Os cortes foram então desidratados em álcool 95%, seguindo-se secagem e pré-hibridação dos tecidos com solução de pré-hibridação (NaPO₄ 20mM / Solução Denhardt 1x / Sulfato Dextran 0,1%) durante 1 hora a 37°C. Após acréscimo da sonda para detecção do EBV (concentração final: 0,25ng/mL), os cortes foram mantidos em câmara úmida a 37°C *overnight*. Amplificação do sinal de hibridação foi realizada através do método avidina-biotina-peroxidase, e a revelação realizada com solução contendo

3,3'-diaminobenzidina (DAB). A contracoloração foi feita com verde de metila, seguindo-se desidratação dos cortes em gradientes sucessivos de álcool e posterior montagem das lâminas com Permount. A leitura das reações foi realizada ao microscópio óptico convencional. Células revelando positividade quanto à presença do EBV apresentam marcação nuclear, resultado da precipitação do cromógeno nos sítios de ligação da sonda ao RNA viral. Controle positivo (caso de linfoma de Burkitt ou linfoma de Hodgkin EBV-positivo) foi empregado em todas as reações.

Para pesquisa do EBV nos casos de HLFR optou-se por triagem com PCR para amplificação de segmento do gene viral BNLF-1, que codifica a LMP-1 do EBV, reservando-se a HIS para os casos que eventualmente se mostrassem positivos. Os iniciadores empregados estão apresentados na Tabela III. Os constituintes da reação foram: solução tampão (Tris-Cl 20mM pH 8,4 / KCl 50mM), MgCl₂ 2,5mM, dNTP 0,2mM, 1,25U de Taq DNA polimerase, 0,4μM de cada iniciador e cerca de 8ng/μl do DNA de amostra. O perfil de ciclagem empregado foi 94°C – 5' (1x); 94°C – 1', 58°C – 1', 72°C – 1' (40x); 72°C – 7' (1x).

Tabela III - Tamanho dos amplicons e iniciadores para amplificação de segmentos de LMP-1.

Alvo	Iniciadores	Amplicon
Gene LMP-1 do EBV	LMP1S – 5'-CGGAAGAGGTGGAAAACAAA-3' LMP1A – 5'-GTGGGGGTCGTCATCATCTC-3'	161pb (sem deleção) ou 131pb (del 30pb)

2.1.4.5 Análise Estatística:

A análise dos resultados foi feita empregando-se o teste de Goodman (1965) para estudo da relação entre os fenótipos de produção de IL-10 (GCC/GCC associado com alta expressão de IL-10, GCC/ATA, GCC/ACC e GTA/ACC associados com média expressão e ATA/ATA, ATA/ACC e ACC/ACC associados com baixa expressão), e os genótipos compostos pela distribuição dos SNPs nas posições -1082 e -819/-592 em relação aos subtipos de LH, idade dos pacientes e infecção pelo EBV. O teste de χ^2 foi utilizado para estudo da relação entre os fenótipos de produção de IL-10, os genótipos nas posições -1082 e -819/-592 em relação aos dados de estadiamento do LH nos casos em que essas informações estavam disponíveis (n=25). Foram considerados estatisticamente significativos os resultados que apresentaram $\alpha < 0,05$.

2.1.5 Resultados

Os diferentes genótipos na posição -1082 e os fenótipos para produção de IL-10 não apresentaram significância estatística quando se comparou o grupo de LH e o grupo controle. Entretanto, o genótipo GG na posição -1082 (fenótipo de alta produção de IL-10) foi significativamente menos prevalente que os demais genótipos, tanto nos casos de LH quanto nos de HLFR (Tabela IV). A frequência dos diferentes genótipos para as posições -819/-592 também não foi significativa quando se comparou o grupo de LH e o grupo de HLFR. Por outro lado, o genótipo TT/AA nas posições -819/-592 foi significativamente menos prevalente em relação ao genótipo CT/CA nos casos de HLFR, além de significativamente menos prevalente em relação aos demais genótipos nos casos de LH (Tabela V).

Tabela IV – Contribuição do polimorfismo de IL-10 na posição -1082 em casos de HLFR e de Linfomas de Hodgkin.

Condição	Genótipo			n
	GG (fenótipo de alta produção de IL-10)	GA (fenótipo de média produção de IL-10)	AA (fenótipo de baixa produção de IL-10)	
HLFR (controle)	0,08 aA	0,38 aB	0,54 aB	50
LH	0,13 aA	0,47 aB	0,40 aB	65

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LH: Linfoma de Hodgkin

Tabela V – Contribuição do polimorfismo de IL-10 nas posições -819/-592 em casos de HLFR e de Linfomas de Hodgkin.

Condição	Genótipo			n
	CC/CC	CT/CA	TT/AA	
HLFR (controle)	0,36 aAB	0,46 aA	0,18 aB	50
LH	0,46 aA	0,48 aA	0,06 aB	65

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LH: Linfoma de Hodgkin

Em relação ao EBV, 4 casos de HLFR foram positivos para PCR (amplificação de segmento do gene viral BNLF-1), mas nenhum desses casos revelou-se positivo na HIS para EBER-1. Baseado na ausência de células HRS positivas para EBER-1 na HIS, os casos foram considerados negativos quanto à infecção viral, uma vez que a elevada sensibilidade da técnica de PCR propicia resultados falso-positivos em decorrência da presença de linfócitos não-neoplásicos EBV-positivos no tecido ou, a despeito do rigoroso controle nos ensaios de amplificação, eventual contaminação das amostras de DNA avaliadas. Desse modo, os testes estatísticos envolvendo avaliação da infecção pelo EBV foram efetuados somente nos casos de LH.

O genótipo GG na posição -1082 (fenótipo de alta produção de IL-10) foi mais prevalente em casos de LH EBV-positivos do que em casos de LH EBV-negativos. Além disso, o genótipo GG na posição -1082 e o fenótipo para alta produção de IL-10 foi significativamente menos prevalente dos que os demais genótipos e fenótipos em casos de LH EBV-negativos, o que não aconteceu no grupo de casos de LH EBV-positivos, no qual não se foi observada diferença significativa na frequência dos diferentes genótipos encontrados (Tabela VI). Não houve discriminação importante nos genótipos observados para as posições -819/-592 quando se comparou o grupo de LH EBV-positivo e o grupo de LH EBV-negativo. Entretanto, o genótipo TT/AA nas posições -819/-592 foi significativamente menos prevalente do que os demais genótipos, tanto em casos de LH EBV-positivos e LH EBV-negativos (Tabela VII).

Tabela VI - Contribuição do polimorfismo de IL-10 na posição -1082 em casos de Linfomas de Hodgkin EBV+ e EBV-.

Condição	Genótipo			n
	GG (fenótipo de alta produção de IL-10)	GA (fenótipo de média produção de IL-10)	AA (fenótipo de baixa produção de IL-10)	
LH EBV+	0,22 aA	0,44 aA	0,33 aA	36
LH EBV-	0,03 bA	0,48 aB	0,48 aB	29

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LH: Linfoma de Hodgkin

Tabela VII - Contribuição do polimorfismo de IL-10 nas posições -819/-592 em casos de Linfomas de Hodgkin EBV+ e EBV-.

Condição	Genótipo			n
	CC/CC	CT/CA	TT/AA	
LH EBV+	0,50 aA	0,44 aA	0,06 aB	36
LH EBV-	0,41 aA	0,52 aA	0,07aB	29

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LH: Linfoma de Hodgkin

Em relação aos subtipos de LH e os genótipos na posição -1082, não se observou diferença ao se comparar o grupo de LHCM e o grupo de LHEN. Entretanto, o genótipo GG na posição -1082 foi significativamente menos prevalente do que os demais genótipos nos casos de LH subtipo celularidade mista, o que não foi observado nos casos de LH subtipo esclerose nodular (Tabela VIII). Os genótipos da posição -819/-592 também não apresentaram diferença significativa ao se comparar o grupo de LH subtipo celularidade mista e o grupo de LH subtipo esclerose nodular. Entretanto, o genótipo TT/AA nas posições -819/-592 foi significativamente menos prevalente do que os demais genótipos nos casos de LH subtipo celularidade mista e nos de LH subtipo esclerose nodular (Tabela IX).

Tabela VIII - Contribuição do polimorfismo de IL-10 na posição -1082 em casos de Linfomas de Hodgkin subtipos celularidade mista e esclerose nodular.

Condição	Genótipo			n
	GG (fenótipo de alta produção de IL-10)	GA (fenótipo de média produção de IL-10)	AA (fenótipo de baixa produção de IL-10)	
LHCM	0,10 aA	0,48 aB	0,41 aB	29
LHEN	0,19 aA	0,48 aA	0,32 aA	31

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LHCM: linfoma de Hodgkin subtipo celularidade mista, LHEN: linfoma de Hodgkin subtipo esclerose nodular.

Tabela IX - Contribuição do polimorfismo de IL-10 nas posições -819/-592 em casos de Linfomas de Hodgkin subtipos celularidade mista e esclerose nodular.

Condição	Genótipo			n
	CC/CC	CT/CA	TT/AA	
LHCM	0,48 aA	0,41 aA	0,10 aB	29
LHEN	0,45 aA	0,55 aA	0 aB	31

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LHCM: Linfoma de Hodgkin subtipo celularidade mista, LHEN: Linfoma de Hodgkin subtipo esclerose nodular

Em relação à idade, os genótipos na posição -1082 e os fenótipos para produção de IL-10 não apresentaram diferença em termos de frequência quando se comparou o grupo de LH pediátrico e o grupo de LH adulto. Entretanto, o genótipo GG na posição -1082 e o fenótipo para alta produção de IL-10 foi significativamente menos prevalente dos que os demais genótipos nos casos de LH adulto, o que não foi observado nos casos de LH pediátrico (Tabela X). Por sua vez, os genótipos da posição -819/-592 não apresentaram diferença significativa quanto à frequência quando se comparou o grupo de LH pediátrico e LH adulto. Entretanto, o genótipo TT/AA nas posições -819/-592 foi significativamente menos prevalente do que os demais genótipos tanto em casos de LH pediátrico e LH adulto (Tabela XI).

Tabela X - Contribuição do polimorfismo de IL-10 na posição -1082 em casos de Linfomas de Hodgkin pediátrico e adulto.

Condição	Genótipo			n
	GG (fenótipo de alta produção de IL-10)	GA (fenótipo de média produção de IL-10)	AA (fenótipo de baixa produção de IL-10)	
LH pediátrico	0,22 aA	0,44 aA	0,33 aA	18
LH adulto	0,11 aA	0,47 aB	0,43 aB	47

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LH: Linfoma de Hodgkin

Tabela XI - Contribuição do polimorfismo de IL-10 nas posições -819/-592 em casos de Linfomas de Hodgkin pediátrico e adulto.

Condição	Genótipo			n
	CC/CC	CT/CA	TT/AA	
LH pediátrico	0,44 aA	0,56 Aa	0 aB	18
LH adulto	0,47 aA	0,45 aA	0,085 aB	47

Letras minúsculas: comparam proporções de condição para cada genótipo (coluna)

Letras maiúsculas: comparam proporções de genótipos para cada condição (linha)

Letras iguais: indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$) pelo teste de Goodman

LH: Linfoma de Hodgkin

A Figura 1 mostra Hibridação *in situ* com sonda biotinilada complementar ao transcrito do gene EBER-I do EBV em caso de Linfoma de Hodgkin subtipo celularidade mista. As Figuras 2 e 3 mostram os géis de poli-acrilamida para as posições -592 e -1082, respectivamente.

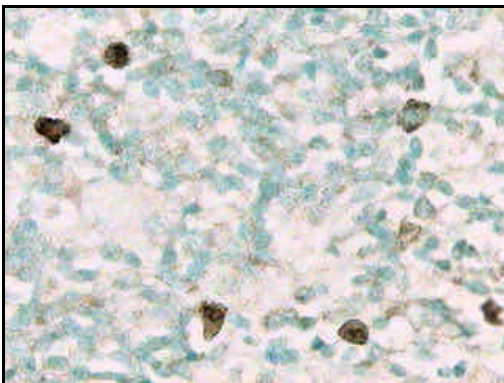


Figura 1 – Hibridação *in situ* com sonda biotinilada complementar ao transcrito do gene EBER-I do EBV em caso de Linfoma de Hodgkin subtipo celularidade mista. Células HRS EBV-positivas apresentam deposição nuclear do cromógeno (3,3' diaminobenzidina) nos sítios de ligação da sonda-RNA viral (contra-coloração com verde-metila; aumento de 400x)

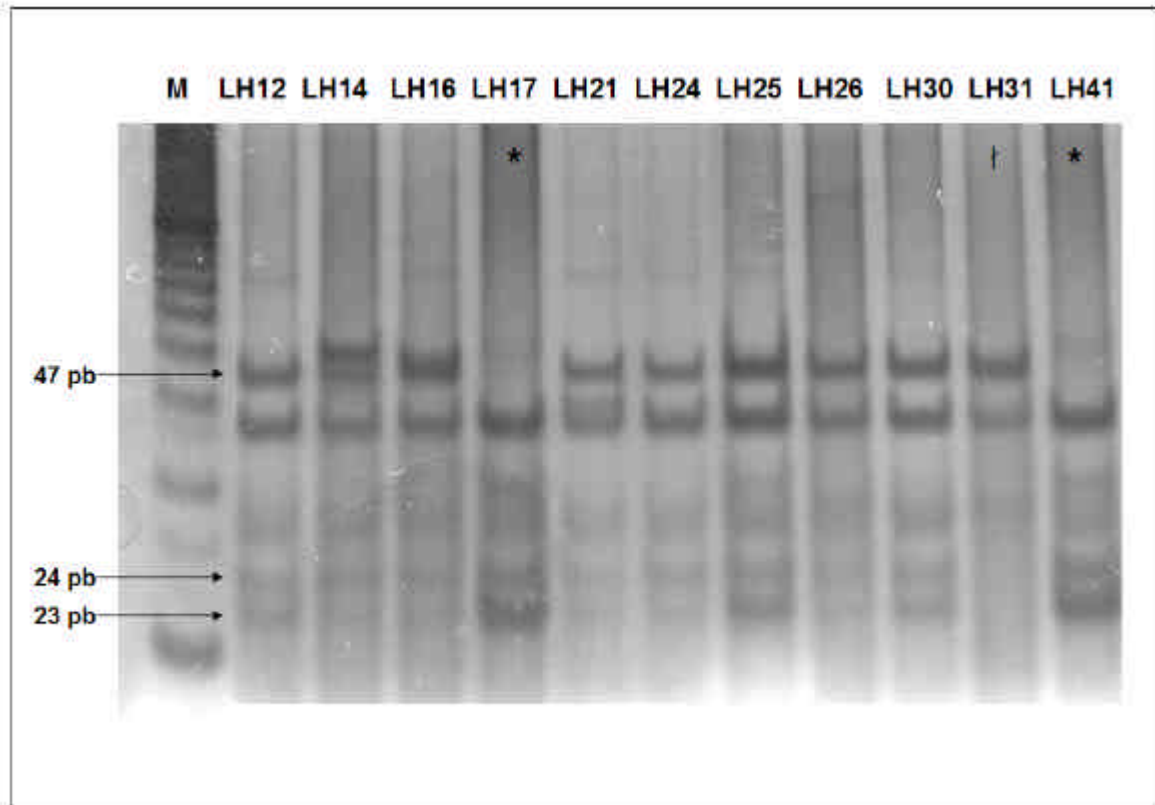


Figura 1 - Gel de poli-acrilamida a 14% mostrando os fragmentos da digestão enzimática da posição -1082 sob eletroforese de 120V e tempo de corrida de 4h. * Amostras com ausência da banda de 47 pb indicando homozigose para o alelo G. | Amostra com ausência das bandas de 24 pb e 23 pb indicando homozigose para o alelo A.

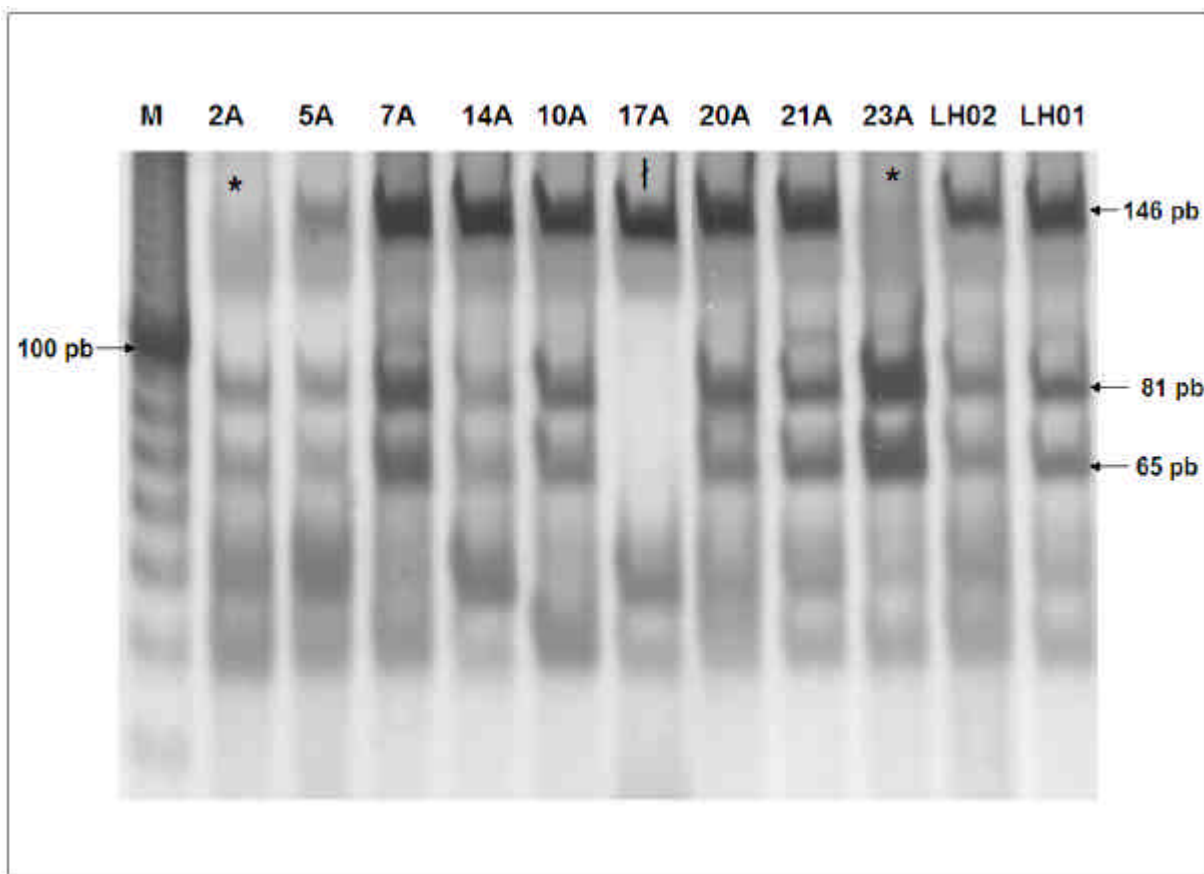


Figura 2 - Gel de poliácridamida a 7% mostrando os fragmentos obtidos pela digestão enzimática da posição -592 sob eletroforese a 120V e tempo de corrida de 2h30.* Amostras com ausência da banda de 146 pb indicando homozigose para o alelo A. | Amostra com ausência das bandas de 81 pb e 65 pb indicando homozigose para o alelo C.

Em relação aos casos de LH com estadiamento disponível, não houve diferença significativa entre os estadiamentos I, II, III ou IV nos casos de Linfoma de Hodgkin e os fenótipos para alta, média ou baixa produção de IL-10, assim como para os genótipos nas posições -1082 e -592/-819. Também não houve diferença significativa quando se avaliou comprometimento da medula óssea ou presença de sintomas B.

2.1.6 Discussão

São escassos e imprecisos os dados estatísticos sobre o linfoma de Hodgkin no Brasil. Em relatório publicado em 2003 sobre os aspectos epidemiológicos de diferentes neoplasias malignas no município de São Paulo, são citados 809 casos de LH entre os anos de 1997 a 1999, dos quais 55,4% eram pacientes do sexo masculino e 44,6% do feminino. Desses casos, 15,7% resultaram em óbito no período (Universidade do Estado de São Paulo, 2003).

Polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) em seqüências regulatórias 5'-3' podem atuar sobre a transcrição, alterando a estrutura dos sítios de ligação dos fatores de transcrição nas seqüências promotoras dos genes. Com relação aos SNPs nas posições -1082, -819 e -592 na região promotora do gene codificador da IL-10, três haplótipos têm sido descritos na população caucasiana: ATA, ACC e GCC (Doncel *et al*, 2002). Mok *et al* (1998) estudando pacientes com lupus eritematoso sistêmico (LES), encontraram também o haplótipo GTA na população chinesa. Com poucas exceções, a maioria dos autores descreve que a combinação de haplótipos GCC/GCC está associada com alta expressão de IL-10, GCC/ATA, GCC/ACC e GTA/ACC com expressão intermediária e ATA/ATA, ATA/ACC e ACC/ACC com baixa expressão da citocina. Por outro lado, em relação à posição -1082, tem sido descrito que o genótipo GG está ligado à alta produção de IL-10, enquanto baixa produção é esperada para o genótipo AA (Pelletier *et al*, 2000; Tambur *et al*, 2001). Além disso, a região compreendida entre -750 pb e -350 pb pode conter seqüências regulatórias envolvidas na supressão de IL-10 nos linfócitos B (Kube *et al*, 1995).

A distribuição das freqüências alélicas pode ser substancialmente diferente nas várias populações. Estudo realizado com população holandesa encontrou 23,7% do genótipo GG, 48,6% de AA e 27,7% de AA na posição -1082 e 59,8% de CC, 34% de CT e 6,2% de TT na posição -819. O mesmo estudo realizado com população do Rio de Janeiro, Brasil, encontrou 5,8% de GG, 50,9% de GA e 43,3% de AA na posição -1082 e 44% de CC, 44,7% de CT e 11,3% de TT na posição -819 (Moraes *et al*, 2003). No presente trabalho foram encontrados 8% do genótipo GG, 38% de GA e 54% de AA para casos controles e 13% de GG, 47% de GA e 40% de AA nos casos de LH. Para as posições -819/-592, foram encontrados 36% CC/CC, 46% CT/CA e 18% de TT/AA para controles e 46% de CC/CC, 48% de CT/CA e 6% de TT/AA

para LH. Desse modo, os dados do presente trabalho estão em consonância com os citados anteriormente, que indicam que os genótipos GG na posição -1082 e TT na posição -819 são menos freqüente na população brasileira.

O padrão anormal de citocinas observado no LH pode não só contribuir para a proliferação de células HRS, mas também para a manutenção de ambiente apropriado no qual a resposta imunitária do hospedeiro contra células HRS não seja efetiva. É importante salientar que células HRS podem contribuir para a ineficácia da resposta imunitária ao expressar citocinas imunossupressoras como IL-10, que estimulam resposta Th2. Bohlen *et al* (2000) demonstraram que, embora não tenha sido verificada associação entre níveis de IL-10 com sexo do paciente, estágio, subtipo histológico e envolvimento extra-nodal do LH, houve associação entre alta produção de IL-10 e indivíduos com idade acima de 45 anos. Adicionalmente, os mesmos autores relataram que o aumento na produção de IL-10 está associado com pior prognóstico. No presente trabalho, não foi verificada diferença significativa na freqüência dos fenótipos com diferentes níveis de produção de IL-10 e os genótipos nas posições -1082 e -592/-819 quando se comparam casos de LH pediátrico e LH adulto.

Beck *et al* (2001) estudaram biópsias de pacientes com LH e relataram expressão de IL-10 em células HRS somente nos casos EBV-positivos. Alguns trabalhos relatam aumento na transcrição do RNAm da IL-10 em células HRS de casos EBV-positivos em relação a casos EBV-negativos (Ohshima *et al*, 1995; Herbst *et al*, 1996). Estudo recente demonstrou associação de níveis elevados de IL-10 e elevada carga viral do EBV em desordens linfoproliferativas pós-transplante (Muti *et al*, 2003). No presente estudo, o genótipo GG e a combinação de haplótipos para alta produção de IL-10 estão mais ligados a casos de LH EBV-positivos em comparação aos LH EBV-negativos. Os outros genótipos na posição -1082/fenótipos de produção de IL-10 parecem não diferir entre LH EBV-positivos e LH EBV-negativos. Os polimorfismos nas posições -819/-592 parecem também não diferir em relação a casos EBV-positivos e casos EBV-negativos.

Dukers *et al* (2000) descreveram maior expressão de IL-10 em LHEN EBV-positivos em relação aos EBV-negativos (35,2% vs 18,1%). Munro *et al*. (2003) não encontraram associação entre os genótipos nas posições -1082 e -592 e os diferentes subtipos do LH. No presente trabalho, não houve diferença significativa dos ge-

nótipos que refletem diferentes níveis de expressão de IL-10 entre casos de LH subtipo celularidade mista e LH subtipo esclerose nodular.

Em trabalho recente, Myhr *et al* (2003) relataram que os genótipos -592 CC e -819 CC foram significativamente mais freqüentes em pacientes com síndrome Guillain-Barré do que em casos controles. Entretanto, em pacientes com a síndrome, estes genótipos não influenciavam a severidade da doença. Em outro estudo realizado com homens centenários associou o genótipo GG na posição -1082 (fenótipos para alta produção de IL-10) a longevidade em pessoas do sexo masculino (Lio *et al*, 2003). Por outro lado, Pickard *et al* (1999) não encontraram diferença nas freqüências haplotípicas dos casos de esclerose múltipla em relação aos controles; adicionalmente, não foi observada influência genética da produção de IL-10 sobre a causa da doença. Outro estudo relatou que os haplótipos da IL-10 também parecem não ser importantes na susceptibilidade à asma, mas podem determinar a severidade da doença (Lim *et al*, 1998).

Em síntese, o presente trabalho demonstrou aumento na freqüência do genótipo GG na posição -1082 da seqüência promotora do gene da IL-10 em casos de LH EBV-positivos em relação aos casos de LH EBV-negativos. Esse dado levanta a hipótese de que o desenvolvimento do LH em um contexto de infecção pelo EBV pode estar associado a uma susceptibilidade geneticamente definida pela presença de polimorfismos no gene codificador da IL-10 que se associam ao fenótipo de elevada produção da citocina. Não foi verificada diferença nas freqüências dos diferentes SNPs/IL-10 pesquisados nas posições -1082 e -819/-592 com os subtipos do LH ou idade dos pacientes. Em função do número reduzido de casos em que os dados clínicos estavam disponíveis, a ausência de diferença significativa na freqüência dos diferentes SNPs/IL-10 pesquisados em relação aos estádios da doença deve ser considerada com cautela. Assim sendo, estudos adicionais são necessários para o esclarecimento do eventual impacto da distribuição de SNPs/IL-10 no curso clínico do LH em casos EBV-positivos e EBV-negativos.

2.1.7 Referências Bibliográficas

Armstrong, A.A., Alexander, F.E., Paes, R.P., Morad, N.A., Gallagher, A., Krajewski, A.S., Jones, D.B., Angus, B., Adams, J., Cartwright, R.A., Onions, D.E., Jarrett, R.F. (1993). Association of Epstein-Barr Virus with pediatric Hodgkin's disease. *American Journal of Pathology*, **142**, 1683-1688.

Barber, M.D., Powell, J.J., Lynch, S.F., Fearon, K.C.H., Ross, J.A. (2000). A polymorphism of the interleukin-1 β gene influences survival in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, **83**, 1443-1447.

Beck, A., Pazolt, D., Grabenbauer, G.G., Nicholls, J.M., Herst, H., Young, L.S., NIE-Dobitek, G. (2001). Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. *Journal of Pathology*, **194**, 145-151.

Bohlen, H., Kessler, M., Sextro, M., Diehl, V., Tesch, H. (2000). Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. *Annals of Hematology*, **79**, 110-113.

Doncel, A.M., Rubio, A., Arroyo, R., De Las Heras, V., Martin, C., Arquero, M.F., De La Concha, E.M. (2002). Interleukin-10 polymorphism in Spanish Multiple Sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, **131**, 168-172.

Dukers, D.F., Jaspars, L.H., Vos, W., Oudejans, J.J., Hayes, D., Cillessen, S., Middeldorp, J.M., Meijer, C.J.L.M (2000). Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles in Epstein-Barr virus-positive and -negative cases of Hodgkin's disease. *Journal of Pathology*, **190**, 143-149.

Eskdale, J., Keijsers, V., Huizinga, T., Gallagher, G (1999). Microsatellite Alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun.*, **1**, 151-155.

Flavell, K.J., Murray, P.G. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus (2000). *Molecular Pathology*, **53**, 262-269.

Gallagher, A., Perry, J., Shield, L., Freeland, J., Mackenzie, J., Jarret, R.F (2002). Viruses and Hodgkin disease: no evidence of novel herpesviruses in non-EBV-associated lesions. *International Journal of Cancer*, **101**, 259-264.

-
- Goodman, L. A (1965). On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Tecnometrics*, **7**, 247-254.
- Haluska, F., Brufsky, A. M., Canellos, G. P. (1994). The cellular biology of the Reed-Sternberg cell. *Blood*, **84**, 1005-1019.
- Helminen, M.E., Kilpinen, S., Virta, M., Hurme, M (2001). Susceptibility to primary Epstein-Barr Virus infection is associated with Interleukin-10 gene promoter polymorphism. *The Journal of Infectious Diseases*, **184**, 777-780.
- Helminen, M.E., Lahdenpohja, N., Hurme, M (1999). Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, **180**, 496-499,.
- Herbst, H., Foss, H.D., Samol, J., Araujo, I., Klotzbach, H., Krause, H., Agathangelou, A., Niedobitek, G., Stein, H. (1996). Frequent expression of interleukin-10 Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood*, **87**, p.2918-2929.
- Hodgkin, T. (1832). On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico Chirurgical Transactions*, **17**, p.69-114.
- Jarret, R.F. (2002). Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology*, **13**, 23-29.
- Khan, G., Coates, P.J (1994). The role of Epstein-Barr virus in the patogenesis of Hodgkin's disease. *Journal of Pathology*, **174**, 141-149.
- Kube, D., Platzter, C., Von Knethen, A., Straub, H., Bohlen, H., Hafner, M., Tesch, H. (1995). Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine*, **7**, 1-7.
- Lim, S., Crawley, E., Woo, P., Barnes, P. J. (1998). Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. *Lancet*, **352**, 113.
- Lio, D., Scola, L., Crivello, A., Romano, G. C., Candore, G., Bonafe, M., Cavallone, L., Marchegiani, F., Olivieri, F., Franceschi, C., Caruso, C (2003). Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10-1082 promoter SNP and its interaction with TNF- α -308 promoter SNP. *Journal of Medical Genetics*, **40**, 296-299.
-

-
- Maggio, E.; Van Der Berg, A.; Diepstra, A.; Kluiver, J.; Visser, L.; Poppema, S. (2002). Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Annals of Oncology*, **13**, 52-56.
- Mira, J.P.; Cariou, A.; Grall, F.; Delclaux, C.; Losser, M.R.; Heshmati, F.; Cheval, C.; Monchi, M.; Teboul, J.L.; Riche, F.; Leleu, G.; Arbibe, L.; Mignon, A.; Delpech, M.; Dhainaut, J.F. (1999). Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*, **282**, 561-568.
- Mok, C.C., Lanchbury, J.S., Chan, D.W., Lau, C.S. (1998). Interleukin-10 promoter polymorphism in southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatology*, **41**, 1090-1095.
- Moos, V., Rudwaleit, M., Herzog, V., Hohlig, K., Sieper, J., Muller B (2000). Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1 β or Interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheumatology*, **43**, 2417-2422.
- Moraes, M. O., Santos, A. R., Schonkeren, J. J. M., Vanderborght, P. R., Ottenhoff, T. H. M., Moraes, M. E., Moraes, J. R., Sampaio, E. P., Sarno, E. N., Huizinga, T. W. J. (2003). Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. *Immunogenetics*, **54**, 896-899.
- Munro, L. R., Johnston, P. W., Marshall, S. J., Canning, S. G., Hewitt, K., Tveita, K., Vickers, M. A. (2003). Polymorphisms in the Interleukin-10 and interferon gamma genes in Hodgkin Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, **44**, 2083-2088.
- Muti, G., Klersy, C., Baldanti, F., Granata, S., Oreste, P., Pezzetti, L., Gatti, M., Gargantini, L., Caramella, M., Mancini, V., Gerna, G., Morra, E. (2003). Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in EBV-positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *British Journal of Haematology*, **122**, 927-933.
- Myhr, K. M., Vagnes, K. S., Maroy, T. H., Aarseth, J. H., Nyland, C. A., Vedeler, C. A. (2003). Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with Guillain-Barré syndrome. *Journal of Neuroimmunology*, **139**, 81-83,
- Ohshima, K., Suzumiya, J., Akamatu, M., Takeshita, M., Kikuchi, M. (1995). Human and viral interleukin-10 in Hodgkin's disease, and its influence on CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *International Journal of Cancer*, **62**, 5-10.
-

-
- Pelletier, R., Pravica, V., Perrey C., Xia, D., Ferguson, R.M., Hutchinson, Orosz, C. (2000). Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation. *Transplantation*, **70**, 674-680.
- Pickard, C., Mann, C., Sinnott, P., Boggild, M., Hawkins, C., Strange, R. C., Hutchinson, I. V., Ollivier, W. E. R., Donn, R. P. (1999). Interleukin-10 (IL-10) promoter polymorphism and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, **101**, 207-210.
- Skinnider, B.F., Mak, T.W. (2002). The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, **99**, 4283-4297.
- Suarez, A., Castro, P., Alonso, R., Mozo, L., Gutierrez, C (2003). Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation*, **75**, 711-717.
- Tambur, A.R., Ortegell, J.W., Bem Ari, Z., Shabtai, E., Klein, T., Micchowiz, R., Turner Kaspas, R., Mor, E. (2001). Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. *Transplantation*, **71**, 1475-1480.
- Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran, D., Lazarus, S, M, Sinnott, P.J., Hutchinson, I.V. (1997). An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *European Journal of Immunogenetics*, **24**, 1-8.
- Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia (2003). Aspectos epidemiológicos do câncer no município de São Paulo. São Paulo. <<http://www.hygeia.fsp.usp.br/rcsp/>>. Acesso em: 12 maio. 2004.
- Weiss, L.M., Chen, Y. Y., Liu, X-F., Shibata, D. (1991). Epstein-Barr Virus and Hodgkin's Disease: A correlative In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction study. *American Journal of Pathology*, **139**, 1259-1265.
- Yung, L., Linch, D. (2003). Hodgkin's lymphoma. *Lancet*, **361**, 943-951.
-

3 Capítulo 3

3.1 Anexos

Quadro 1 - Casos de Linfoma de Hodgkin e Hiperplasia Linfóide Folicular Reativa estudados.

Índice	Origem	Sexo	Idade	EBER	Diagnóstico	-1082	-819	-592	Haplótipos possíveis	Fenótipo [†]
LH 01	UNESP	M	28 anos	neg	LHCM	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 02	UNESP	M	18 anos	pos	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 03	UNESP	M	38 anos	pos	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 04	UNESP	F	18 anos	pos	LHEN	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 05	UNESP	F	60 anos	pos	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 06	UNESP	M	21 anos	neg	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 07	UNESP	F	59 anos	pos	LHCM	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 08	UNESP	M	63 anos	pos	LHEN	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 09	UNESP	M	18 anos	neg	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 10	UNESP	M	25 anos	neg	LHEN	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 11	UNESP	M	37 anos	pos	LHCM	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 12	UNESP	F	23 anos	neg	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 14	UNESP	M	37 anos	pos	LHCM	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 15	UNESP	M	10 anos	pos	LHEN	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 16	UNESP	M	2 anos	neg	LHCM	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 17	UNESP	M	21 anos	pos	LHCM	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 20	UNESP	F	22 anos	neg	LHPL	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 21	UNESP	M	5 anos	pos	LHCM	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 22	UNESP	M	25 anos	pos	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 23	UNESP (CO)	M	30 anos	neg	LHEN	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 24	UNESP (CO)	M	26 anos	pos	LHCM	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 25	UNESP (CO)	F	47 anos	pos	LHEN	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 26	UNESP (CO)	F	70 anos	pos	LHCM	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 27	UNESP (CO)	F	36 anos	neg	LHCM	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
LH 28	UNESP (CO)	F	41 anos	pos	LHEN	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 29	UNESP (CO)	F	59 anos	pos	LHCM	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 31	UNESP (CO)	M	53 anos	pos	LHEN	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 32	UNESP (CO)	M	44 anos	pos	LHCM	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 35	UNESP (CO)	F	52 anos	pos	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 36	UNESP (CO)	M	35 anos	pos	LHCM	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 37	UNESP (CO)	F	19 anos	neg	LHEN	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 38	UNESP (CO)	M	51 anos	neg	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 39	UNESP (CO)	F	33 anos	neg	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 40	UNESP (CO)	M	34 anos	neg	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 41	UNESP (CO)	F	46 anos	pos	LHEN	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 42	UNESP (CO)	F	21 anos	pos	LHEN	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 43	UNESP	M	14 anos	pos	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 45	UNESP	F	14 anos	neg	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 47	UNESP	M	13 anos	neg	LHEN	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 49	UNESP	M	8 anos	neg	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 50	UNESP	F	12 anos	pos	LHCM	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 52	UNESP (CO)	M	3 anos	pos	LHCM	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 55	UNESP (CO)	M	15 anos	pos	LHCM	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
LH 56	UNESP (CO)	M	11 anos	neg	LHEN	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 57	UNESP (CO)	M	criança	pos	LHCM	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 58	UNESP	M	6 anos	neg	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 59	UNESP	F	25 anos	neg	LHEN	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 60	UNESP	M	40 anos	neg	LHEN	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média

Índice	Origem	Sexo	Idade	EBER	Diagnóstico	-1082	-819	-592	Haplótipos possíveis	Fenótipo [†]
LH 61	UNESP	M	52 anos	neg	LHCM	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
LH 62	UNESP	M	20 anos	neg	LHEN	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 64	Consultoria	M	22 anos	pos	LHCM	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 65	Consultoria	F	60 anos	pos	LHCM	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 66	Consultoria	M	9 anos	pos	LHCM	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 67	Consultoria	F	41 anos	neg	LHCM	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 68	Consultoria	M	24 anos	pos	LHCM	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
LH 70	Consultoria	M	42 anos	pos	LHCM	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 71	Consultoria	M	33 anos	pos	LHCM	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
LH 72	Consultoria	M	42 anos	pos	LHCM	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 73	Consultoria	M	35 anos	neg	LHCM	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 75	Consultoria	M	5 anos	neg	LHPL	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
LH 76	Consultoria	M	47 anos	neg	LHPL	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 77	Consultoria	F	47 anos	neg	LHPL	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
LH 78	Consultoria	F	19 anos	neg	LHCM	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
LH 79	Consultoria	F	66 anos	pos	LHCM	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
LH 80	Consultoria	M	37 anos	neg	LHPL	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
1B	UNESP	F	9 anos	neg	HLFR	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
2B	UNESP	M	4 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
3B	UNESP	M	8 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
4B	UNESP	M	4 anos	neg	HLFR	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
5B	UNESP	M	7 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
6B	UNESP	F	12 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
7B	UNESP	M	8 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
8B	UNESP	F	14 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
9B	UNESP	M	6 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
10B	UNESP	M	11 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
12B	UNESP	F	12 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
13B	UNESP	F	11 anos	neg	HLFR	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
14B	UNESP	F	3 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
15B	UNESP	M	3 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
16B	UNESP	F	9 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
17B	UNESP	F	8 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
19B	UNESP	M	4 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
20B	UNESP	M	7 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
21B	UNESP	F	4 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
22B	UNESP	M	6 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
23B	UNESP	M	7 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
24B	UNESP	M	13 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
26B	UNESP	M	9 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
27B	UNESP	M	8 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
28B	UNESP	F	0 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
29B	UNESP	F	2 anos	neg	HLFR	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
30B	UNESP	F	4 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
31B	UNESP	M	13 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
32B	UNESP	M	9 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
34B	UNESP	F	12 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
35B	UNESP	F	12 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
36B	UNESP	F	7 anos	neg	HLFR	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
38B	UNESP	F	10 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
39B	UNESP	M	11 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
40B	UNESP	F	3 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média

Índice	Origem	Sexo	Idade	EBER	Diagnóstico	-1082	-819	-592	Haplótipos possíveis	Fenótipo [†]
41B	UNESP	F	6 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
42B	UNESP	M	5 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
43B	UNESP	M	5 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
45B	UNESP	M	7 anos	neg	HLFR	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
47B	UNESP	F	7 anos	neg	HLFR	GA	CT	AC	GCC/ATA ou GTA/ACC	média
49B	UNESP	F	9 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
50B	UNESP	F	9 anos	neg	HLFR	AA	TT	AA	ATA/ATA	baixa
52B	UNESP	F	7 anos	neg	HLFR	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
53B	UNESP	F	6 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
54B	UNESP	M	9 anos	neg	HLFR	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
61B	UNESP	M	11 anos	neg	HLFR	AA	CT	AC	ACC/ATA	baixa
67B	UNESP	M	7 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média
68B	UNESP	F	9 anos	neg	HLFR	AA	CC	CC	ACC/ACC	baixa
71B	UNESP	M	7 anos	neg	HLFR	GG	CC	CC	GCC/GCC	alta
73B	UNESP	F	7 anos	neg	HLFR	GA	CC	CC	GCC/ACC	média

LHEN – linfoma de Hodgkin subtipo esclerose nodular, **LHCM** – linfoma de Hodgkin subtipo celularidade mista, **LHPL** – linfoma de Hodgkin predominância linfocítica nodular, **HLFR** – Hiperplasia Linfóide Folicular Reativa (casos controles), [†] Refere-se ao fenótipo em relação à produção de IL-10, **UNESP** = Faculdade de Medicina de Botucatu, **UNESP (CO)** = Faculdade de Medicina de Botucatu (Casos em Consulta), **Consultoria** = Laboratório Consultoria em Patologia.

Quadro 2 – Dados de estadiamento, comprometimento da medula óssea e presença de sintomas B em alguns casos de Linfoma de Hodgkin

Índice	Estadiamento inicial	Sintomas B / M.O.	Observações
LH 01	I	B+ / M.O. -	Estadiamento IV B (abandonou o tratamento várias vezes)
LH 02	II	B+ / M.O. -	Após 5 anos de tratamento relatada sonolência e manchas nos braços
LH 03	IV	B+ / M.O.+	Sem seguimento
LH 04	III	B+ / M.O. n.d.	Aparecimento de massa ganglionar em região supraclavicular
LH 05	IV	B+ / M.O.+	Sem seguimento
LH 06	IV	B+ / M.O. -	5 anos de seguimento sem queixas
LH 07	II	B+ / M.O. -	9 anos de seguimento sem queixas
LH 10	II	B+ / M.O. -	8 anos de seguimento sem queixas
LH 11	I	B+ / M.O. -	10 anos de seguimento sem queixas
LH 12	II	B- / M.O. -	10 anos de seguimento sem queixas
LH 14	I	B- / M.O. -	10 anos de seguimentos sem queixas
LH 16	III	B- / M.O. -	Sem seguimento
LH 20	I	B+ / M.O.-	Estadiamento III B (perdeu acompanhamento)
LH 21	II	B- / M.O.-	11 anos de seguimento sem queixas
LH 22	I	B- / M.O. -	9 anos de seguimento sem queixas
LH 43	III	B+ / M.O. -	2 anos de seguimento sem queixas

Índice	Estadiamento inicial	Sintomas B / M.O.	Observações
LH 45	III	B+ / M.O. -	11 anos de seguimento sem queixas
LH 47	IV	B+ / M.O.+	9 anos de seguimento sem queixas
LH 49	III	B- / M.O. -	Sem seguimento
LH 50	II	B- / M.O. -	8 anos de seguimento sem queixas
LH 58	III	B+ / M.O. -	11 anos de seguimento sem queixas
LH 59	IV	B+ / M.O. -	2 anos de seguimento sem queixas
LH 60	IV	B+ / M.O.+	3 anos de seguimento sem queixas
LH 61	IV	B+ / M.O. n.d.	Sem seguimento
LH 62	n.d.	B n.d. / M.O. -	Sem seguimento

M.O.+/- = Presença ou ausência, respectivamente, de infiltração da medula óssea por Linfoma de Hodgkin,

B+/- = Presença ou ausência, respectivamente, de sintomas B (febre intermitente, perda de peso e sudorese noturna),

n.d. = não diagnosticado