

## UMA APRECIACÃO DO TUMOR DE BURKITT\*

DR. JOSEPH H. BURCHENAL



A quimioterapia geográfica pode ser definida como o estudo das respostas aos quimioterápicos apresentada por tumores semelhantes que ocorrem em regiões geográficas diferentes. Tira partido da desigualdade da incidência de certos tumores em várias áreas geográficas, diferencia essa presumivelmente devida a fatores ambientais ou genéticos: 1) para realizar a melhor quimioterapia possível no tratamento de vários tumores sensíveis, como o coriocarcinoma ou o tumor de Burkitt, que constituem sérios problemas em certos países; 2) para determinar se os tumores de aspecto anátomo-patológico semelhante em diversas regiões, respondem de maneira semelhante à quimioterapia. Se forem encontradas diferenças, pode sugerir-se que fatores genéticos ou ambientais também afetam a resposta à quimioterapia.

O Dicionário Universal Oxford define um "stalking horse" como "um cavalo treinado para permitir que um mastim se esconda debaixo ou atrás dele de modo a

chegar bem perto da caça sem alarmá-la". Podemos dizer, por analogia, que o tumor de Burkitt pode servir de "stalking horse" em relação à leucemia, querendo com isso sugerir que o estudo cuidadoso do tumor de Burkitt pode desvendar o caminho para possível controle da leucemia aguda.

A maior parte dos dados que apresentarei provém da Conferência sobre tumor de Burkitt que teve lugar em Kampala, Uganda, em janeiro de 1966, sob os auspícios da "Union Internationale Contre le Cancer".

O tumor de Burkitt é o tumor mais frequente das crianças africanas e compreende mais da metade de todos os tumores que ocorrem em crianças em várias regiões (11, 16, 18, 38, 56). Tem sido encontrado também na Nova Guiné (80), Brasil (50), Colômbia (6), Índia (Desai, P. B. — comunicação pessoal), Inglaterra (Wright, D. H. — comunicação pessoal), e até mesmo, ocasionalmente, nos Estados Unidos (17, 58, 87). Na África constitui o tumor de Burkitt entidade clínica definida, diagnosticável

Estes estudos foram patrocinados pelas seguintes bolsas: U.S.P.H.S., Research Contract SA-43-ph-2445, Cancer Chemotherapy National Service Center, National Cancer Institute, U.S.P.H.S. Research Grant CA-05826, National Cancer Institute; NCI Grant T 45, American Cancer Society, Delaware Division, e a Campbell Townsend Memorial Grant for Cancer Research from the American Cancer Society.

\* O presente artigo é publicado com autorização especial de "Cancer Research", onde apareceu com o título: "Geographic chemotherapy-Burkitt's Tumor as a Stalking Horse for Leukemia". Cancer Research 12:2393-2405, 1966.

pelo quadro clínico, pela distribuição patológica (38, 56, 86), pela citologia (86) e pela microscopia com contraste de fase (70). O'Connor e Davies (56) classificaram histologicamente o tumor de Burkitt como um linfoma maligno do tipo linfocítico pouco diferenciado. Observaram estes autores a presença de histiócitos grandes, de aparência espumosa, espalhados entre as células linfóides, dando ao tumor aspecto característico, denominado "céu estrelado". Wright (86) descreve as preparações citológicas do tipo "imprint", coradas pelo método de May Grunwald-Giemsa ou pelo método Wright, da seguinte maneira: (Fig. 1a). "As células

mente entre as células linfóides". As figuras 2a, b, c, mostram células semelhantes da medula óssea de crianças do Memorial Hospital. Pulvertaft (70) acredita que os grânulos constituam o principal critério diagnóstico quando se usa a microscopia de fase. Esses grânulos coram-se pelo ácido ósmico.

Os tumores que se originam destas células apresentam-se nas mandíbulas e nas vísceras abdominais, poupando, relativamente, os gânglios linfáticos superficiais (12, 56). Os tumores de mandíbula são mais comuns em crianças de baixa idade. Onde a incidência é elevada, os tumores de mandíbula são freqüentes e a média de idades

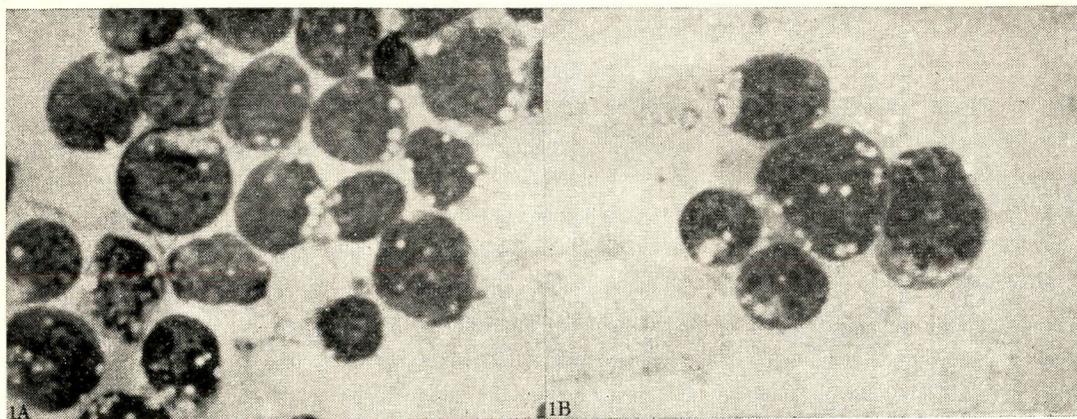


Figura 1a e 1b

Preparações de impressão coradas pelo May Grunwald-Giemsa e obtidas de pacientes com tumor de Burkitt em Kampala, pelo Dr. D. H. Wright.

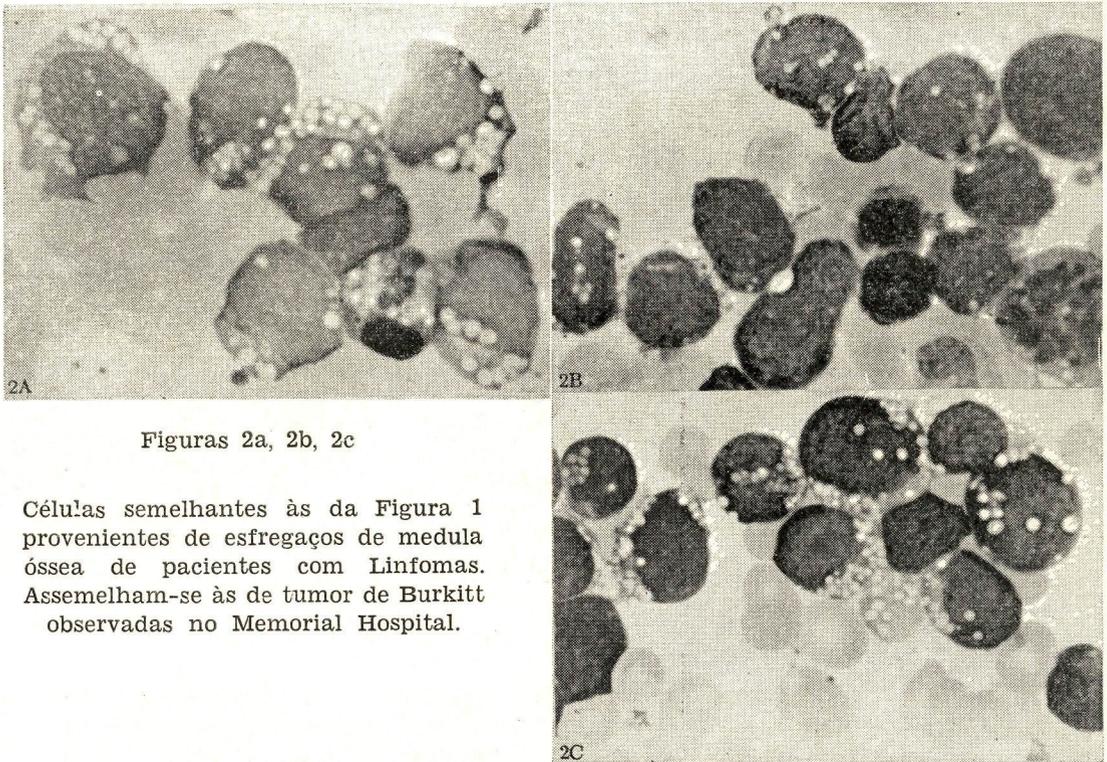
linfóides têm 20 a 30 micra de diâmetro. Embora variem de tamanho, não variam no grau aparente de maturação. Seus núcleos são redondos, ovais ou bipartidos e têm um padrão de cromatina pontilhada. Os nucléolos são em número de 2 a 5, mas não são muito conspícuos nas preparações coradas pelo Giemsa. O citoplasma forma orla bem definida em torno do núcleo: é intensamente basófilo, com exceção de uma área mais clara, adjacente à indentação nuclear. Os vacúolos citoplasmáticos estão sempre presentes, em pelo menos algumas das células, porém seu número varia grandemente. Fragmentos destacados do citoplasma vacuolar (Fig. 1b) podem ser vistos usual-

é relativamente baixa. Nos lugares em que a incidência é baixa, os tumores de mandíbula são menos freqüentes e a média de idades parece ser mais elevada (12). Isto se aplica particularmente aos casos encontrados na Europa e nos Estados Unidos, uma vez que, nesta base, seria de esperar uma baixa incidência de tumores de mandíbula. O tumor de Burkitt se restringe a nódulos localizados. Na África o acometimento generalizado da medula óssea é raro, embora tal não aconteça nos Estados Unidos (86). Ele ocorre por todo o Centro e Sudoeste da África. Parece ser dependente de certas condições de temperatura e umidade (85), exigindo temperatura anual mínima acima

de 60° F e chuvas que ultrapassem 20 polegadas por ano. No que concerne a vetores artrópodos a área endêmica corresponde, de maneira muito aproximada, à existência de mosquitos (85). Os tipos *Anopheles* e *Mansonia* são os que se ajustam melhor a esta distribuição. (4, 85).

No que concerne a vírus, quer do ponto de vista etiológico, quer como agentes

vírus em uma célula da linhagem Jiyoye (68, 70), isolada por Osunkoya e Pulvertaft e examinada por De Harven (comunicação pessoal). Tais partículas também foram encontradas em doentes nativos dos Estados Unidos e em casos em que o isolamento foi feito nos Estados Unidos, porém, em paciente originário de Ibadan. Bell (5) também isolou vírus Reo em vários casos



Figuras 2a, 2b, 2c

Células semelhantes às da Figura 1 provenientes de esfregaços de medula óssea de pacientes com Linfomas. Assemelham-se às de tumor de Burkitt observadas no Memorial Hospital.

passageiros, uma partícula de vírus semelhante ao do herpes foi encontrada por Epstein (19, 21), Stewart (79), O'Connor (57) e outros, em muitas linhagens de cultura de células, não apenas provenientes de Kampala, porém, em vários casos, por isolamentos diferentes, em Ibadan e nos Estados Unidos. A fig. 3-A mostra partículas de

tumor de Burkitt, e, anticorpos para o Reo 3 foram encontrados em 73% dos pacientes de linfoma e em 18% dos casos de controle. Stanley (77) relatou ter evidenciado infecções pelo Reo 3 em mosquitos da Austrália, e que estes vírus produzem síndrome de nanismo em camundongos. O baço de alguns destes camundongos com

nanismo também produzem nanismo e, ocasionalmente linfomas, em camundongos isólogos.

Burkitt (9), Ngu (55) e Clifford (14) relataram os resultados obtidos com a quimioterapia no tratamento desta doença. O Methotrexate foi eficaz quando adminis-

trado em regime de doses semelhante ao usado por Hertz (36) no coriocarcinoma, e produziu remissões prolongadas nos casos precoces, porém, foi menos eficiente nos casos moderadamente adiantados e nos muito avançados. (59). Não teve qualquer ação quando empregado na pequena dose

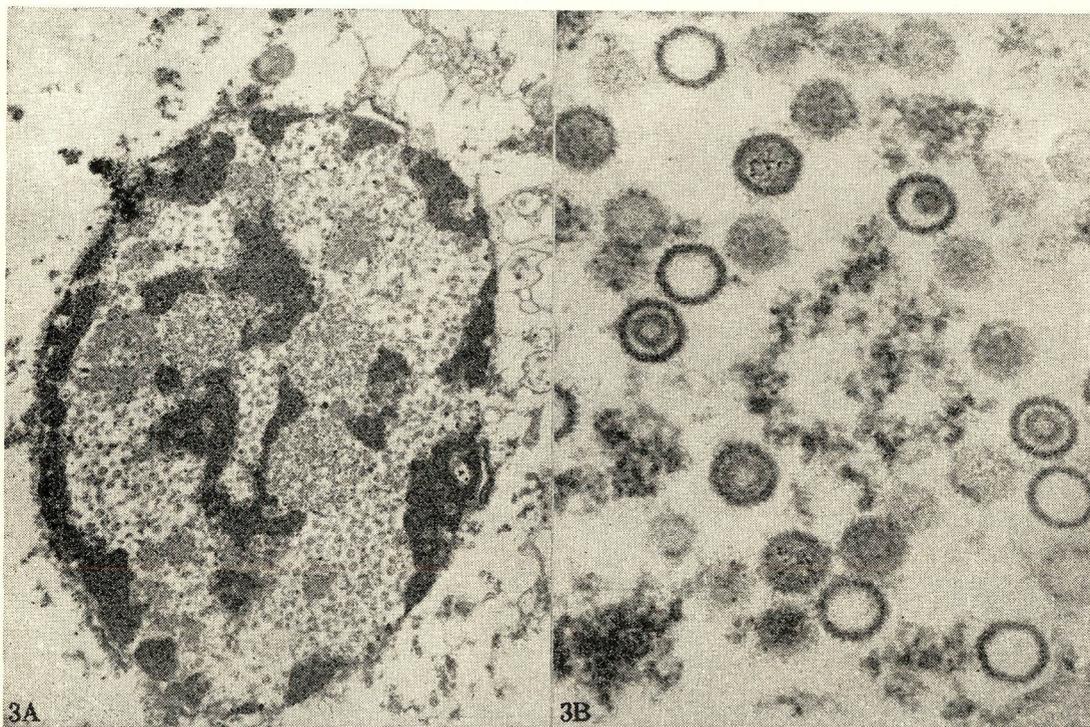


Figura 3a

Núcleo degenerado da linhagem de células "JIYOYE". O citoplasma já desapareceu quase completamente e a cromatina está marginalizada e condensada. Vêm-se muitas partículas entre as massas de cromatina. Estas partículas têm diâmetros quase idênticos e sua estrutura fina é vista melhor na Fig. 2. Coloração para microscopia eletrônica com uranyl e chumbo. Aumento de 16.000 vezes.

Figura 3b

Proveniente de outra amostra da linhagem "JIYOYE", envelhecida propositadamente para aumentar o número de células em degeneração. Este maior aumento de microfotografia eletrônica mostra a estrutura fina das partículas frequentemente observadas dentro dos núcleos das células em degeneração. Estas partículas têm, em média, 100 a 110  $\mu$  de diâmetro. Aparecem inicialmente nos núcleos das células em degeneração e adquirem uma membrana adicional em uma fase citoplásmica subsequente do seu desenvolvimento. Do ponto de vista morfológico assemelham-se muito aos vírus do grupo herpes. Preparação corada com uranyl e chumbo. Aumento de 94.000 vezes.

diária, oral, que usualmente se administra aos doentes de leucemia aguda. A Ciclofosfamida (Enduxan, Cytoxan), parece ser tão eficaz quanto o methotrexate em casos iniciais e mais eficaz do que êle em casos moderada ou grandemente avançados (9, 60, 13). Outros agentes alquilantes, como o Melfalan e o Orthomelfalan, são também ativos (14). A vincristina produziu regressões rápidas, porém passageiras e, na maior parte dos casos, o tumor de localização extra-mandibular, recidivou rapidamente. Isto parece ser comparável ao que sucede na leucemia aguda, na qual a vincristina provoca remissões com grande rapidez porém, se o tratamento é interrompido, a remissão é relativamente curta. Surpreendentemente, a vinblastina, a prednisona, a 6-mercaptopurina e a metilhidrazina parecem ser ineficazes nos casos estudados.

O aspecto importante do tratamento do tumor de Burkitt, e isto se relaciona particularmente ao methotrexate e ao Enduxam,

é a ocorrência de longa sobrevivência, que algum dia poderá ser chamada de "cura". Se somarmos os 88 casos relatados por Burkitt (9), os 54 de Ngu (53, 55) e os 39 de Clifford (14), veremos que houve regressões completas em 40% dos casos de Burkitt, em 24% nos de Ngu e em 21% nos de Clifford. Dos 25 casos, ou 14%, que presentemente estão perfeitamente bem, sem qualquer sinal da doença e sem qualquer tratamento de manutenção, Burkitt tem 14, Ngu, cinco e Clifford, seis. Dêstes pacientes 3 já sobrevivem entre 6 meses e um ano, 6 pacientes entre 1 e 2 anos, seis entre 2 e 3 anos, sete entre 3 e 4 anos, e três entre 4 e 6 anos. Burkit (9) afirma nunca ter visto recidiva em paciente que tivesse permanecido em remissão durante 12 meses, após a interrupção do tratamento. A figura 4 mostra doze dêstes sobreviventes a longo prazo, como foram apresentados na Conferência de Kampala, por Burkitt, em janeiro de 1966.



Figura 4

Paciente com tumor de Burkitt sem sinais de doença por períodos de seis meses a seis anos depois da interrupção do tratamento.

SURVIVAL OF 139 PATIENTS WITH ACUTE LEUKEMIA LIVING 5 YEARS OR MORE FROM DIAGNOSIS

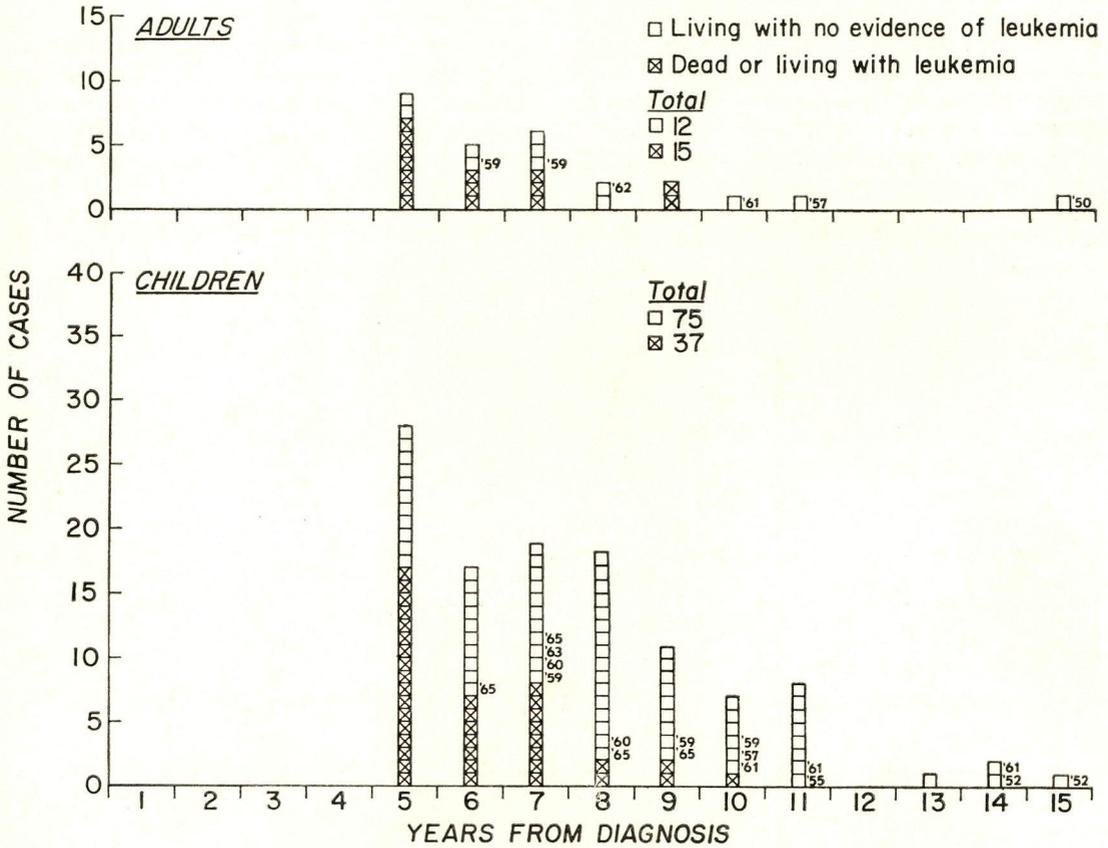


Figura 5

139 pacientes com leucemia aguda que sobreviveram mais de 5 anos a contar da data do diagnóstico, de uma pesquisa mundial levada a cabo sob o patrocínio da "Acute Leukemia Task Force". Os números após os quadrados abertos indicam o ano em que o tratamento terminou.

Um número significativo destes 181 casos não pôde ser seguido clinicamente (follow-up), sendo que alguns deles poderão aparecer posteriormente sendo então incluídos no grupo dos que não apresentavam sinais de doença. Se retirarmos o número correspondente a estes pacientes que não foram seguidos, com o argumento de que é possível, senão muito provável, que o fato de não terem voltado ao hospital é devido a estarem curados, e não porque morreram, chega-se à conclusão de que Burkitt tem nos seus 40% de casos em remissão completa, 52% curados. Isto daria, aproximada-

mente, 20% do grupo inicial, sem sinal de doença. Esta cifra é muitíssimo mais alta do que a encontrada em qualquer outro tumor espontâneo, inclusive leucemia aguda. Nesta última doença, segundo o relatório do "Acute Leukemia Task Force Long Term Survivors Registry", figura 5, vê-se, presentemente, 139 pacientes que sobreviveram 5 anos ou mais após o diagnóstico de leucemia aguda. Doze de 27 adultos e 75 de 112 crianças estão vivos e bem, sem sinais de leucemia, 5 a 15 anos após o diagnóstico. O número total de pessoas componentes da população de leucêmicos que deu

êste número de sobreviventes é desconhecido e, desta forma, não se tem idéia de percentual de incidência dêstes sobreviventes após 5 e 15 anos. As maiores cifras, até a presente data, para sobreviventes de 5 anos, são as de Zuelser (88 — comunicação pessoal), que teve 10 sobreviventes com 5 anos, em 285 casos consecutivos de leucemia

Quanto à pesquisa de novos agentes quimioterápicos, Goldin (30) analisou técnicas de busca (enquadramento) que podem ser úteis no tumor de Burkitt. Parece que a leucemia L-1210 do camundongo e o carcinoma 256 de Walker, do rato, absorvem a maioria das substâncias que demonstraram ter atividade clínica, tais como o Enduxam,

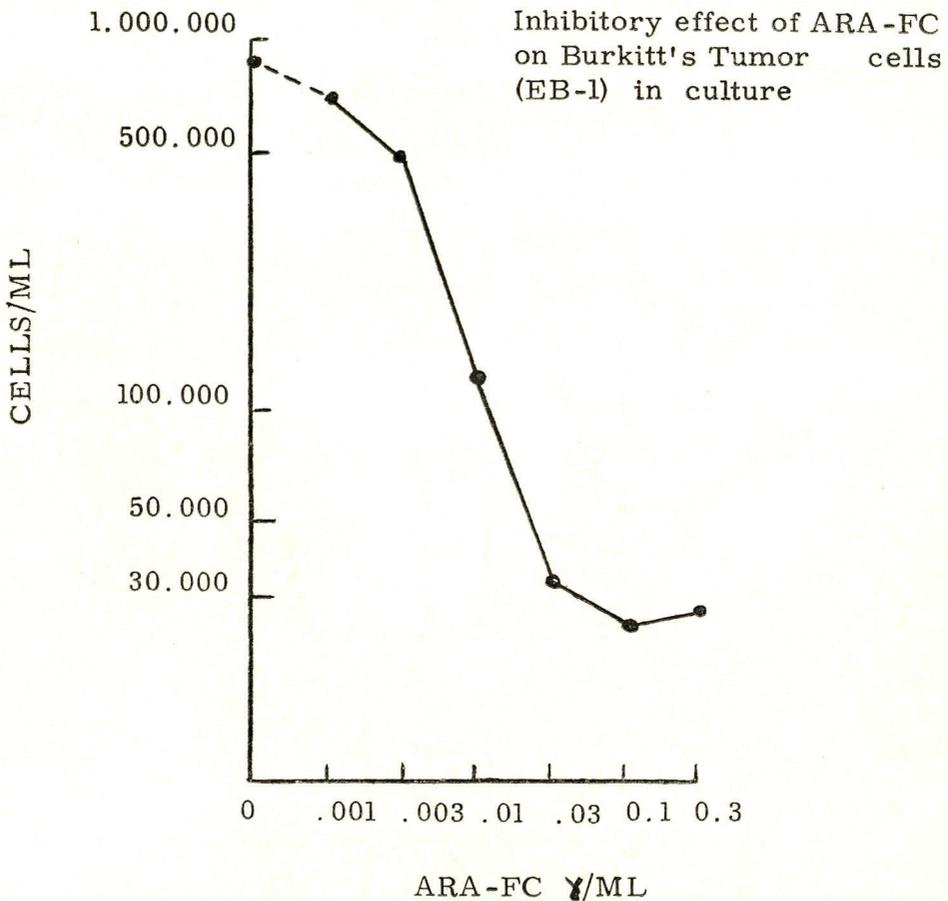


Figura 6

Efeito inibidor da ARA-FC sôbre as células do tumor de Burkitt (EB-1) em cultura.

aguda em crianças que se internaram no Detroit's Children's Hospital, o que dá sobrevivência de 5 anos, em 35% dos casos. Naturalmente, no coriocarcinoma, cerca de 75% dos casos têm sobrevida longa (35), presumivelmente cura, porém, trata-se de tumor transplantado, de origem fetal e não um tumor espontâneo do hospedeiro.

o Methotrexate, a Vincristina, a Actinomicina D, o Melphalan e o Orthomerphalan, da mesma forma que as células da leucemia aguda.

O próprio tumor de Burkitt, também, pode ser adaptado ao estudo de enquadramento, utilizando técnicas *in vitro*. Foi demonstrado por Epstein (20, 23), Pulver-

taft (69) e Osunkoya (66, 67), que linhagens contínuas de células de tumor de Burkitt podem ser obtidas em culturas de células, com grau considerável de regularidade. A dose inibitória de 50% (ID.50), de vários compostos contra estas linhagens pode ser determinada com relativa facilidade. Osunkoya e nosso grupo (66,8) já referiram que as culturas de células, usando várias linhagens de células de tumor de Burkitt, podem ser úteis na avaliação de novos agentes em potencial, porém, ainda é muito cedo para tentar fazer qualquer correlação clínica.

Usamos em nossos estudos uma modificação da técnica de Fischer (25). Linhagens celulares do tumor de Burkitt EB-1, 2 e 3,

células (3 gerações) e 1 milhão de células/ml (5 gerações).

A figura 6 mostra o efeito de concentrações variadas de 1-A-D-arabino-furanosyl-5-fluorocytosina no crescimento de células de Burkitt da linhagem EB-1. A Tabela I mostra a ID 50 para a EB-1 de um número de antimetabólicos, agentes alquilantes, antibióticos e substâncias derivadas de fontes naturais. Pode-se ver que dos vários anti-metabólicos 1-B-D-arabino-furanosyl-cytosina (ara C) e a 1-B-D-arabino-furanosyl-5-fluorocytosina (ara-FC), com uma ID-50 de, aproximadamente 0,003 a 0,005 un/ml parecem ser iguais ao methotrexate, porém, considera-

TABELA 1

DOSE INIBIDORA DE 50% CONTRA A LINHAGEM EB-1  
DE CÉLULAS DE TUMOR DE BURKITT EM CULTURA

COMPOSTO	DOSE (g / )
ARA-FC .....	0.003
ARA-C .....	0.005
METHOTREXATE .....	0.008
6-MERCAPTOPYRINA .....	3.0
HYDROCORTISONA .....	40.0
ACTINOMICINA D .....	0.002
VINCRISTINA .....	0.005
DAUNOMICINA .....	0.08

isoladas por Epstein (20, 23), e as raças Kudi e Ogun, isoladas por Pulvertaft e Osunkoya (67, 69), foram semeadas em meio de Ealge, chamado de "meio mínimo essencial" (MEM), ao qual se juntou. aminoácidos não essenciais, extra glutamina, 15% de sôro de feto de vitela, 200 un/ml de penicilina e 200 mcg/ml de esptreptomina. Usamos inicialmente uma concentração celular de 30.000/ml e as células foram colocadas em 5 ml do meio, em tubos de 16 ml com tampa de aparafusar pela técnica de Fischer. Os tubos foram fortemente arrolhados e incubados por 168 horas a 37° C. As contagens de contrôlo ao fim deste tempo oscilavam, usualmente, entre 250.000

velmente melhores do que a 6-mercaptopurina com uma ID-50 de, aproximadamente, 3 ug/ml. A mostarda nitrogenada e o thio-Tepa foram moderadamente ativas, tendo como ID-50, aproximadamente, 0,2 ug/ml. A ciclofosfamida (Cytoxan, Enduxan) por outro lado, embora muito ativa clinicamente, foi ineficaz neste sistema, como era de esperar, uma vez que há necessidade de ativação da droga no fígado, para que exerça efeito citotóxico. A vincristina e a Actinomicina D foram muito ativas, com uma ID-50 de 0,005 ug/ml e 0,001 ug/ml respectivamente.

A ID-50 da vincristina, methotrexate, e ara-FC, contra um espectro de 6 linhagens

de cultura de células de tumor de Burkitt, estão representadas na Tabela 2. Há, no máximo, uma variação de 3 vezes na sensibilidade. O emprêgo dêste sistema para estudar os mecanismos de ação está demonstrado pelo bloqueio do efeito inibidor da ara-FC pela deoxycytidina (Fig. 7). Outros estudos mostraram que esta inibição não pode ser bloqueada pela cytidina, thymidina, adenosina.

A maior desvantagem de técnica de busca que utilize culturas de tecido é a falta de controle da toxicidade inespecífica das substâncias. Nestes estudos procuramos evitar

reções qualitativas ou quantitativas no metabolismo do composto.

$$\frac{\text{MDT homem}}{\text{MED camundongo}} = \frac{\text{ID-50 células de Burkitt}}{\text{ID-50 células de camundongo}}$$

Desta forma a dose de 1,0 mg/kg por dia, em pacientes, durante 5 a 8 dias, produziu regressão completa em uma alta percentagem de tumores iniciais e, no camundongo,

TABELA 2

DOSE INIBIDORA DE 50% CONTRA LINHAGENS DE CULTURAS DE CÉLULAS OBTIDAS COM CÉLULAS DO TUMOR DE BURKITT

LINHAGENS DE CULTURAS DE CÉLULAS	DOSE (g / ML)		
	VCR	MTX	ARA-FC
EB-3 .....	0.005	0.008	0.003
EB-1 .....	0.005	0.02	0.01
EB-2 .....	0.005	0.02	0.003
SL - 1 .....	0.005	0.03	—
KUDI .....	0.002	0.008	0.01
OGUN .....	0.005	0.02	0.01

êste impecilho comparando a ID-50 nas células de tumor de Burkitt e nas da leucemia P-815 do camundongo reproduzidas *in vitro*, com dose máxima tolerada no homem (MTD), e a dose mínima diária eficaz (MED) no camundongo. Desta forma, para determinado composto, a MTD (em mg/kg) do homem dividida pela MED (em mg/kg) do camundongo é igual ou maior do que a ID-50 (em ug/ml) para as células do tumor de Burkitt, dividida pela ID-50 (em ug/ml) para as células de leucemia do camundongo, a substância deve ser eficaz contra o tumor de Burkitt, no paciente, partindo do pressuposto de que não haja dife-

1,0 mg/kg, por dia, durante 5 a 10 dias, foi também uma dose eficaz. É ativa, na cultura de células, contra EB-1, na concentração de 0,008 ug/ml e semelhantemente ativa contra as células da leucemia P-815-Y do camundongo. Cálculos semelhantes com a ara-C mostram um índice ainda mais favorável (8).

Há necessidade de aguardar maior correlação clínica para saber se essa técnica será útil para a seleção de novos agentes, clinicamente ativos, em relação ao tumor de Burkitt; os estudos preliminares porém, sugerem que êste possa ser realmente um teste simples e prático.

Os estudos pormenorizados de Skipper e seu grupo (75, 76), sobre o conceito de destruição total das células neoplásicas, parecem particularmente pertinentes no tumor de Burkitt, de vez que a morte do total de células parece ter sido conseguida, ocasionalmente, nesta doença. Isto, ao que tudo indica foi obtido unicamente pela quimioterapia e, como era de esperar, em tumor

muitos investigadores são de opinião que, à luz da presente ineficiência da quimioterapia do câncer em geral, qualquer sobrevivente a prazo longo, em qualquer doença tratada pela quimioterapia, constitui prova a favor da existência da "defesa do hospedeiro". Cada um daqueles autores relatou um caso com remissão temporária que durou de 2 a 3 semanas, após a administração

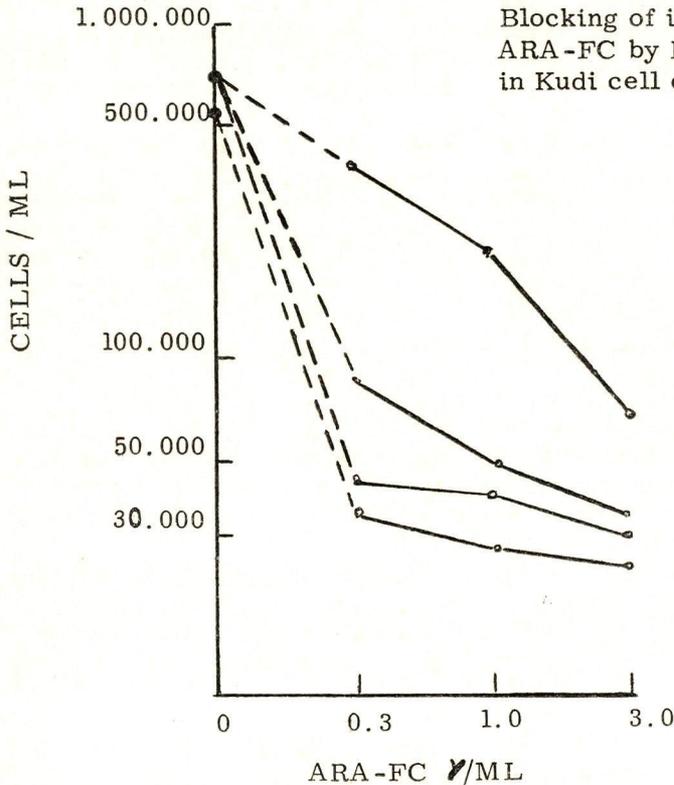


Figura 7

Bloqueio da ação inibidora da ARA-FC pela Deoxycytidina (CdR) na cultura de células de Kudi (168 horas).

sensível. Todavia, o mais provável é que esses resultados sejam devidos à soma dos fatores: sensibilidade ao quimioterápico e resistência do hospedeiro.

Burkitt (10) e Ngu (54) apresentaram provas clínicas de que há defesa do hospedeiro. Descreveram regressões, algumas espontâneas, e algumas, ao que parece, após terapêutica inadequada. Na realidade,

venosa de 100 a 150 ml de plasma de pacientes com tumor de Burkitt em completa remissão. Klein et al. (42) demonstraram que o soro de pacientes em remissão completa reagia positivamente à reação indireta de membrana imunofluorescente, contra um espectro de células-alvo, vivas, de Burkitt, em maior proporção do que o soro de pacientes em remissão parcial ou que não ex-

perimentaram remissão. Os sôros de pacientes com leucemia aguda, na Suécia, reagiram negativamente frente às mesmas células. Os parentes sadios dos pacientes com tumor de Burkitt reagem, usualmente, de forma negativa. Klein (42) declara que, embora a especificidade não possa ser tida como estabelecida de maneira conclusiva, pode ser sugerida pelos seguintes fatos: 1) frequência semelhante de reações positivas obtidas com células-alvo de Burkitt autóctones e alogênicas em 5 dos 6 casos nos quais foi possível fazer tal comparação; 2) tendência dos sôros positivos para reagirem com tôdas ou com a maior parte das células-alvo de Burkitt testadas, obtidas de 5 a 9 pacientes diferentes, na maioria dos casos; 3) ausência de reação contra outras células alogênicas que não eram células-alvos de Burkitt; 4) ausência de qualquer relação entre a aglutinação de hemácias, imunofluorescência, e fluorescência de células-alvo de Burkitt nos casos em que ambas derivavam do mesmo doador; 5) ausência de reatividade contra células normais da medula óssea das células-alvo de Burkitt do doador, quando testadas contra os mesmos sôros Burkitt-positivos.

Os Henles (1, 33, 34) estudaram linhagens de células cultivadas do tumor de Burkitt pelas técnicas de imunofluorescência e fixação do complemento. Pela primeira, todos os 17 sôros de pacientes com tumor de Burkitt foram positivos, em comparação com 35% de positividade encontrada para o sôro de crianças americanas com leucemia, tumores sólidos ou outras doenças. Oitenta e cinco por cento do sôro de adultos normais, entretanto, reagiu positivamente. Pela técnica de fixação do complemento, 12 em 13 sôros, em casos de tumor de Burkitt, foram positivos, contrastando com 20% dos sôros de crianças americanas e 60% dos adultos. As reações de imunofluorescência parecem diferir das relatadas por Klein et al. no fato de que a reação de Henle depende, provavelmente, da presença de um vírus semelhante ao de herpes, nas linhagens estabelecidas, enquanto a reação de Klein parece medir um antígeno da membrana celular presente na superfície de células recém-biopsiadas, mas não presente, pelo menos em concentração elevada, nas linhagens celulares estabelecidas (Klein, 6, comunicação pessoal).

Osunkoya (68) relata a existência de fatores de inibição em muitos sôros normais contra células recém-isoladas do tumor de Burkitt, enquanto que o sôro de pacientes com tumor de Burkitt não teve o efeito inibidor. Desde que o tumor de Burkitt começasse a crescer em cultura contínua, estes sôros normais pareciam ter efeito de estímulo de crescimento, que o sôro de doentes com tumor de Burkitt não tinha.

Estes vários caminhos de pesquisa sugerem que o tumor de Burkitt tem grandes implicações com a leucemia aguda. Mesmo com o reduzido número de medicamentos disponíveis na África, 15 a 20% dos tumores de Burkitt podem ser tratados e desaparecer por longos períodos. Há boa possibilidade de que, com o acréscimo de alguns dos novos agentes, presentemente disponíveis, e terapêutica combinada intensiva, o nível de bons resultados se eleve a 50%. Porque o tratamento do tumor de Burkitt é mais eficaz e duradouro na África, do que o tratamento da leucemia aguda na Europa e nos Estados Unidos? O tumor de Burkitt nos Estados Unidos responde de maneira diferente do africano? O que pode ser aprendido com o tumor de Burkitt que possa ajudar no controle da leucemia? Estas perguntas sugerem especulação de longo alcance.

Examinemos por um momento a possibilidade de que o tumor de Burkitt esteja, de alguma forma, relacionado a leucemia aguda, como Dalldorf (15) e outros sugeriram, talvez sendo mesmo causado pelo mesmo estímulo, que é limitado pela imunidade a tumores localizados, talvez relacionado a tipos e tempos diferentes de exposição ao estímulo hipotético, ou talvez estimulado de maneira inespecífica por infecções bacterianas ou infestações parasitárias. Se o caso fôsse este, o paciente já deveria ter alguma resistência de hospedeiro. Há analogias nas leucemias de roedores. Uma inoculação sub-cutânea de células leucêmicas que induza leucemia generalizada e rapidamente fatal em um camundongo, com alguma defesa de hospedeiro, na base de uma histo-incompatibilidade menor, produz um tumor sólido de crescimento lento. Uma situação possivelmente análoga também ocorre na leucemia aguda. Entre os 139 sobreviventes de longo termo de leucemia aguda foram relatados

linfosarcomas de ovário ou de testículo, como primeiro sintoma de recorrência em oito pacientes.

Isto pode ser semelhante, de alguma forma, à situação existente no tumor de Burkitt. Havia, provavelmente, alguma resistência do hospedeiro, comprovada pela sobrevivência por longo prazo depois da quimioterapia, porém um tumor localizado desenvolveu-se eventualmente. O fato de que alguns destes tumores puderam ser tratados por terapêutica localizada, e nunca ocasionaram leucemia generalizada, reforça a prova da existência de resistência do hospedeiro. Talvez as células neoplásicas, em presença de um certo grau de resistência do hospedeiro, como devia haver nos sobreviventes de prazo longo de leucemia aguda, e nos pacientes com tumor de Burkitt, possam apenas dar origem a um nódulo localizado, em uma comunidade onde possam obter algum apoio mútuo e proteção contra um ambiente hostil. Klein (41) estabeleceu o postulado de que, se a leucemia e o tumor de Burkitt forem causados pelo mesmo agente, pode haver transmissão vertical da mãe para o feto dentro do útero, na leucemia, e neste caso pode-se esperar que haja completa tolerância imunológica. Por outro lado, se o agente, no tumor de Burkitt, fôr transmitido por um vetor artrópode algum tempo depois do nascimento, seria razoável a existência de um certo grau de resistência do hospedeiro, por analogia com as inoculações com o vírus SV-40 e do polyoma no recém-nato, versus no adulto.

Quanto às possíveis alterações do sistema retículo-endotelial, temos que levar em conta que são comuns as infecções repetidas nas populações em que se encontra o tumor de Burkitt. Old et al. (64) demonstraram que o grau de depuração do carbono coloidal do sangue é muito aumentado em camundongos previamente inoculados com BCG. As infecções com BCG tornam os camundongos mais resistentes às infecções por vírus e também a doses letais mínimas de radiação ionizante (2, 61, 63, 65). Este tratamento também produziu um aumento da respostas imunitária a vários antígenos. Biozzi et al. (7) e Hapern et al. (31) mostraram que há inibição do crescimento da ascite de Ehrlich em camundongos e do carcinoma uterino de Guerin em ratos previamente infectados com BCG. Os efeitos

protetores também foram demonstrados por Old et al. (61, 62, 65) no sarcoma 180, na ascite de Ehrlich e no carcinoma 755. Lemonde (45, 46) demonstrou que o BCG exerce efeito inibidor sobre o crescimento da leucemia transplantada e reduz a incidência de alterações malignas, prolongando a sobrevivência de "hamsters" inoculados com BCG, seguido do vírus polyoma uma semana após o nascimento. Weiss et al. (84) mostraram que frações do bacilo da tuberculose (MER) têm atividade protetora contra tumores isólogos em camundongos. Steinkuller et al. (78) ampliaram ainda mais estes estudos sobre o MER. Weiss et al. (84) assinalam que, se a doença neoplásica progressiva é em realidade uma manifestação de deficiência imunológica, seria de esperar que as substâncias que aumentam a produção de anticorpos e a eficiência das reações que libertam o organismo de substâncias estranhas, aumentassem também a resistência ao desenvolvimento dos tumores malignos. Tivemos em mente estas esperanças na realização dos vários sistemas experimentais de tumores mencionados acima e, parece, dentro dos limites da possibilidade, que as muitas e repetidas infecções que essas crianças sofreram aumentou a capacidade do hospedeiro para desenvolver imunidade específica ao tumor de Burkitt.

Além disto, a maior parte dos pacientes com tumor de Burkitt, provém de zonas da África onde a malária é hiper-endêmica e a maior parte dos pacientes mostrava sinais de infestação malárica prévia (aumento do baço, pigmento malárico, etc). Esta hipertrofia do sistema retículo-endotelial poderia também aumentar a capacidade do hospedeiro para reagir a um estímulo específico (29). Barnett (3) mostrou que da infecção concorrente de canários com o parasito de malária, *Plasmodium relictum*, e o vírus da encefalite equina do oeste, resultava em significativa supressão do título de vírus nessas aves. Trager (81, 82) demonstrou que suspensões de Tumor de Galinhas, injetadas em pintos com 2 a 3 semanas de idade, cresciam mais vagarosamente, e ocasionalmente nem cresciam, se fôssem feitas injeções de *Plasmodium lophurae* no mesmo dia ou no dia seguinte. Assim que os pintos se curavam da infecção malárica, entretanto, o tumor crescia com a mesma rapidez que nos controles.

Nadel et al. (52) usando Plasmodium berghei e leucemia L-1210 observaram aumento no tempo de sobrevivência se a malária era inoculada antes.

Para reproduzir a mesma situação que ocorre no tumor de Burkitt seria provavelmente necessário inocular repetidamente camundongos com malária até que algum grau de imunidade à malária se instalasse. Isto é difícil de conseguir com uma raça agudamente virulenta como o *P. berghei*, que mata em 7 a 10 dias, embora seja possível que inoculações repetidas, com a infecção terminada, ou pelo menos efetivamente suprimida no 5º ou 6º dia, com cloroquina, pudesse eventualmente produzir o grau desejado de estímulo retículo-endotelial. O tipo de infecção mais crônica pelo *Plasmodium chabaudi* (43, 44), seria provavelmente mais eficaz. Estes camundongos devem então ser inoculados com doses gradativas e o efeito da leucemia e da terapêutica anti-leucêmica comparados nestes camundongos e camundongos sem malária. Tais estudos estão agora em andamento em nosso laboratório.

Nos últimos 60 anos tem havido vários relatos clínicos dos efeitos benéficos temporários da malária na leucemia (51, 71, 73) e doenças afins (40), porém estes exemplos têm sido, principalmente, em leucemias crônicas, com recaídas floridas e, em nenhum deles, o paciente estava em remissão completa quando a malária foi inoculada. Diminuições temporárias nas contagens totais de leucócitos foram observadas, mas não houve nenhuma influência favorável de caráter permanente (72, 73, 28).

Em um caso de leucemia aguda, entretanto, em um rapaz de 14 anos, tratado provocando infecção com o *Plasmodium vivax*, relatado por Lucherini (49), a contagem de leucócitos caiu de 250.000, com 73% de mieloblastos, para 4.400, depois de 12 episódios febris em 16 dias e, depois de decorridas 6 semanas da febre ter sido tratada com quinino, os leucócitos ainda eram 5.800, com uma contagem diferencial normal e hematimetria de 4.4 milhões/mlc. Houve um decréscimo na esplenomegalia e nas linfadenopatias e notável melhora do estado geral. Infelizmente não foi registrada a sequência posterior do seguimento.

Todos estes estudos sugerem que infecções maláricas prévias em crianças com

tumor de Burkitt podem, em verdade, ter influência na resposta ao tumor.

O que pode ser aprendido com o tumor de Burkitt que venha a ser de utilidade no tratamento da leucemia? A quimioterapia deste tumor difere consideravelmente, no esquema de doses, do esquema empregado em leucemias agudas. O Methotrexate em doses diárias, dadas por via oral não tem efeito no tumor de Burkitt, como ficou demonstrado por Oetgen et al. (59), porém tratamentos maciços a curto prazo são eficazes. Isto é particularmente interessante em vista dos trabalhos de Li, Hertz et al. (47, 48) de que doses maciças durante 5 dias foram mais eficazes no coriocarcinoma do que pequenas doses diárias de methotrexate, dadas até atingir o mesmo grau de toxicidade, e também dos trabalhos de Selawry et al. (74), no qual doses maciças intramusculares de methotrexate, duas vezes por semana, foram superiores a doses orais diárias para manutenção de remissão em crianças com leucemia aguda. O Enduxan também tem sido muito mais eficaz no tumor de Burkitt quando administrado em doses únicas, maciças, repetidas cada 2 ou 3 semanas (9). Talvez se devesse refletir mais sobre esses fatos no que se refere à leucemia aguda. A dificuldade, nos estágios iniciais das leucemias agudas, é que a medula óssea tem quantidades insuficientes de precursores de leucócitos, hemácias e plaquetas pelo que há perigo de agravar o déficit com terapêutica maciça. Alguns estudos neste sentido estão sendo feitos, conforme publicações do National Cancer Institute e do Grupo B de Leucemia (26, 27, 32, 37, 39), porém, é preciso que se faça ainda mais. Por exemplo, após a indução de remissão com vincristina e prednisona, deve-se seguir exatamente a técnica de tratamento preconizada por Burkitt com o Enduxan: 2 doses venosas de 30 a 40 mg/kg, separadas por um intervalo de 2 a 3 semanas, e depois, nenhum outro tratamento até a recidiva. É importante executar exatamente a técnica porque Burkitt pode ter acertado e estabelecido a dose absolutamente correta. É possível que se houvesse ele administrado doses maiores ou menores, não tivesse obtido resultados tão satisfatórios.

O que pode ser feito para anular o déficit imunológico e estimular as defesas do hospedeiro na leucemia aguda? Tomando

por base os debates da Conferência de Kampala e de outros locais, parecem promissoras certas medidas que visam a aumentar as defesas do hospedeiro. Algumas destas medidas já estão sendo estudadas, independentemente das sugestões provenientes do comportamento o tumor de Burkitt. Todas essas tentativas de imunização devem ser tomadas na ocasião em que o paciente com leucemia aguda está em remissão completa, de modo que o excesso antigênico seja reduzido ao mínimo. Não deve haver também tratamento de manutenção que interfira com a indução de imunidade ativa.

## I. Imunização Ativa

### A. Específica

(1) — **Infecção com células leucêmicas autólogas.** Devem ser colhidas quando o doente é admitido inicialmente no hospital, antes do tratamento, e multiplicadas em cultura celular e, se possível, guardadas em congelação até a data da utilização. Podem ser irradiadas e administradas sem alteração, ou homogeneizadas e irradiadas, ou tratadas pela técnica de Weigle (83), na esperança de vencer a tolerância.

(2) — **Infecção com células de tumor de Burkitt irradiadas.** Isto pode ser feito baseando-se na teoria de que o tumor de Burkitt pode ser um pouco mais antigênico do que a leucemia aguda e de que pode haver relação antigênica cruzada (24).

B. Procedimentos para aumentar a capacidade do hospedeiro de desenvolver imunidade específica.

(1) — **Vacinação com BCG ou fração MER.** Isto parece justificável em razão dos dados de experimentação apresentados acima.

(2) — **Indução de malária.** Por analogia com a documentação mencionada acima, poder-se-ia estabelecer o postulado de que a hipertrofia do sistema retículo-endotelial produzida pela malária pode aumentar a capacidade do hospedeiro para desenvolver imunidade específica, quer ao tumor e Burkitt, quer à leucemia, particularmente se a indução fôr feita na ocasião em que a leucemia estiver em completa remissão.

## II. Imunização Passiva

Voluntários poderiam ser imunizados por infecções de células irradiadas, de pacientes com leucemia aguda ou tumor de Burkitt e, depois de algum tempo de circulação, ou após a demonstração da existência

de anticorpos ligados às células, os pacientes com leucemia seriam transfundidos repetidamente com plasma obtido por plasmaforese, ou concentrados de leucócitos, ou fator de transferência de leucócitos, obtido por leucoforese, ou por canulização do canal torácico dos voluntários imunizados. Já mencionamos que Ngu e Burkitt produziram regressões temporárias, objetivas, com duração de 2 a 3 semanas, em pacientes que não tinham recebido qualquer forma de tratamento, portadores de doença ativa, depois da injeção venosa de plasma de outro paciente com tumor de Burkitt, em fase de remissão. Tal imunização passiva, particularmente se tentada na ocasião em que o paciente estiver em remissão produzida pela quimioterapia, parece ser merecedora de maiores estudos. O emprêgo de plasma e leucócitos provenientes de sobreviventes a longo termo parece particularmente pertinente.

Em resumo, o conhecimento atual do tumor de Burkitt sugere 3 maneiras de abordar o tratamento das leucemias agudas:

(1) — Depois que se produz remissão completa com vincristina e prednisona, administrar doses únicas, grandes, ou cursos de pequena duração, porém intensivos, de quimioterapia, que deve ser repetida a intervalos de 2 a 3 semanas.

(2) — Estudo cuidadoso dos pacientes em remissão completa e sem qualquer tratamento de manutenção para evidenciar as defesas do hospedeiro.

(3) — Tentativas de aumentar as defesas do hospedeiro por imunização ativa, específica ou não, ou por imunização passiva específica, na ocasião em que o paciente estiver em fase de remissão completa, porém, não mantida.

As remissões a longo prazo observadas no tumor de Burkitt são provavelmente resultantes da ação combinada da quimioterapia e das defesas do hospedeiro, e esta visão bilateral do problema parece ser essencial na leucemia aguda.

O estudo da quimioterapia geográfica no tumor de Burkitt, comparando-se os resultados do tratamento e as provas de defesa do hospedeiro no paciente em remissão, na África, com documentação semelhante nos Estados Unidos, deverá resultar em valiosos elementos de orientação para o controle da leucemia.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 — ARMSTRONG, D. HENLE, G., and HENLE, W. — Complement-fixation tests with cell lines derived from Burkitt's lymphoma and acute leukemia. *J. Bact.*, 91:1257-62, 1966.
- 2 — BALNER, H., OLD, L. J., and CLARKE, D. A. — Reduction of x-ray lethality in mice by agents affecting the reticulo-endothelial system. *Rad. Res.*, 15:836-40, 1961.
- 3 — BARNETT, H. C. — Experimental studies of concurrent infection of canaries and of the mosquito *Culex Tar-salis* and *Plasmodium relictum* and Western equine encephalitis virus. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 5:99-109, 1956.
- 4 — BARNLEY, G. R. — Discussion of Williams' paper, "Implications of geographic distribution" in Session on "Epidemiology and Etiology in Relation to Chemotherapy", Conference on the Chemotherapy of Burkitt's Tumor, (Kampala, January 1966) Uganda.
- 5 — BELL, T. M. — Review of the evidence for a viral a etiology for Burkitt's lymphoma. IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt (eds.), *Treatment of Burkitt's Tumor*, Berlin, Heidelberg, New York. Springer-Verlag, 1966, In press.
- 6 — BELTRAN, G., BAEZ, A. and CORREA, P. — Burkitt's lymphoma in Colombia. *Amer. J. Med.*, 40:211-16, 1966.
- 7 — BIOZZI, G., STIFFEL, C., HALPERN, B. N., and MOUTON, D. — Effet de l'inoculation du bacille de Calmette-Guérin sur le développement de la tumeur ascitique d'Ehrlich chez la souris. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 153:987-89, 1959.
- 8 — BURCHENAL, J. H., WIGGINS, R. M., and GUTHRIE, E. D. — Cell culture as a technique for evaluating potential chemotherapeutic agents for Burkitt's tumor. IN: J. H. Burchenal, and D. Burkitt, (eds.), *Treatment of Burkitt's Tumor*, *Op. Cit.*
- 9 — BURKITT, D. — Chemotherapy of jaw tumors. *Ibid.*
- 10 — ————. — Clinical evidence suggesting the development of an immunological response against African lymphoma. *Ibid.*
- 11 — ————. — A sarcoma involving the jaws in African children. *Brit. J. Surg.*, 46:216-23, 1958.
- 12 — ————. — Some clinical features. IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt, (eds.), *Op. Cit.*, In press.
- 13 — BURKITT, D., HUTT, M. S. R. and WRIGHT, D. H. — The African lymphoma: Preliminary observations on response to therapy. *Cancer*, 18:399-410, 1965.
- 14 — CLIFFORD, P. — Observations on the treatment of Burkitt's lymphoma. IN: J. H. Burchenal, and D. Burkitt, (eds.), *Treatment of Burkitt's Tumor*, *Op. cit.* in press.
- 15 — DALLDORF, G. — Lymphomas of African children *J.A.M.A.*, 181:1026-28, 1962.
- 16 — DAVIES, A. G. H. and DAVIES, J. N. P. — Tumours of the jaw in Uganda Africans. *Acta, U.I.C.C.*, 16:1320, 1960.
- 17 — DORFMAN, R. F. — Childhood lymphosarcoma in St. Louis, Missouri, clinically and histologically resembling Burkitt's tumor. *Cancer*, 18:418-30, 1965.
- 18 — EDINGTON, G. M., and MACLEAN, C. M. U. — Incidence of the Burkitt tumour in Ibadan, West Nigeria. *Brit. Med. J.*, 1:264-66, 1964.
- 19 — EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G., and BARR, Y. M. — Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 2:702-03, 1964.
- 20 — EPSTEIN, M. A., and BARR, Y. M. — Characteristics and mode of growth of a tissue culture strain (EB<sub>1</sub>) of human lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 34: 231-40, 1965.
- 21 — ————. — Cultivation *in vitro* of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet*, 1:252-53, 1964.

- 22 — EPSTEIN, M. A., BARR, Y. M., and ACHONG, B. G. — The behaviour and morphology of a second tissue culture strain (EB<sub>2</sub>) of lymphoblasts from Burkitt's lymphoma, *Brit. J. Cancer*, 19:108-15, 1965.
- 23 — ————. — Studies with Burkitt's lymphoma. Wistar Inst. Symposium Monographs, 4:69-79, 1965.
- 24 — FINK, M. A., MALMGREN, R. A., RAUSCHER, F. J., ORR, H. C., and KARON, M. — Application of Immunofluorescence to the study of human leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.*, 33: 581-83, 1964.
- 25 — FISCHER, G. A. — Studies of the culture of leukemia cells *in vitro*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 76:673-80, 1958.
- 26 — FREIREICH, E. J., KARON, M., FLATOW, F., and FREI, III, E. — Effect of Intensive cyclic chemotherapy (BIKE) on remission duration in acute lymphocytic leukemia. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 6:20, 1965.
- 27 — FREIREICH, E. J., KARON, M., and FREI, III, E. — Quadruple combination therapy (VAMP) for acute lymphocytic leukemia of childhood. *Ibid.*, 5: 1964.
- 28 — GAMBLE, C. J. — Failure of therapeutic malaria in treatment of leukemia. *J.A.M.A.*, 88:87-90, 1927.
- 29 — GOBLE, F. C., and SINGER, I. — The reticuloendothelial system in experimental malaria and trypanosomiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 88:149-171, 1960.
- 30 — GOLDIN, A. — Potential techniques for developing new chemotherapeutic agents for use in Burkitt's tumor. *IN: J. H. Burchenal, and D. Burkitt, (eds.), Op. Cit.*, in press.
- 31 — HALPERN, B. N., BIOZZI, G., STIFFEL, D., and MOUTON, D. — Effet de la stimulation du système réticulo-endothelial par l'inoculation du bacille de Calmette-Guerin sur le développement d'épithélioma atypique t-8 de Guérin chez le rat. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 153:919-23, 1959.
- 32 — HENDERSON, E. S., FREIREICH, E. J., KARON, M., and ROSSE, W. — High dose combination chemotherapy in acute lymphocytic leukemia of childhood. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 7:30, 1966.
- 33 — HENLE, G., and HENLE, W. — Evidence for a persistent viral infection in a cell line derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.*, 89:252-58, 1965.
- 34 — ————. — Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *Ibid.*, 91:1248-56, 1966.
- 35 — HERTZ, R. — Eight years experience with the chemotherapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. *Proc. UICC Conference on the Chemotherapy of Choriocarcinoma, (Baguio 1965), Philippines.*
- 36 — HERTZ, R., LEWIS, Jr., J., and LIPSETT, M. B. — Five years experience with the chemotherapy of metastatic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. *Amer. J. Obst. and Gyn.*, 82:631-40, 1961.
- 37 — HOLLAND, J. F. — Intensive high dose treatment of children in complete remission of acute lymphocytic leukemia. *IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt, (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor, Op. cit.*
- 38 — HUTT, M. S. R. — The pathology of Burkitt's tumour in the context of lymphomas and leukemias. *Ibid.*
- 39 — KARON, M., FREIREICH, E. J. and CARBONE, P. — Effective combination therapy of adult leukemia. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 634, 1965.
- 40 — KLAUDER, J. V. — Fever therapy of mycosis fungoides. *J.A.M.A.*, 106:201-06, 1936.
- 41 — KLEIN, G. — Chairman of Discussion of "Host Defenses in Relation to Chemotherapy", Conference on the Chemotherapy of Burkitt's Tumor, (Kampala, January 1966), Uganda.
- 42 — KLEIN, G., CLIFFORD, P., KLEIN, E., and STJERNSWÄRD, J. — Search for tumour specific immune reactions in Burkitt's lymphoma patients by the membrane immunofluorescence reaction. *IN: J. H. Burchenal, and D. Burkitt, (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor, Op. cit.*
- 43 — LANDAU, I., and CHABAUD, A. G. — Infection naturelle par deux plas-

- modium* du rongeur *Thamnomys rutilans* en République Centre Africaine. C. R. Acad. Sci. Paris, 261:230-32, 1965.
- 44 — LANDAU, I. — Description de *Plasmodium chabaudi* n. sp., parasite de Rongeurs africains. C. R. Acad. Sci. Paris, 260: 3758-61, 1965.
- 45 — LEMONDE, P. and CLODE, M. — Effect of BCG infection on leukemia and polyoma in mice and hamsters. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 111: 739-42, 1962.
- 46 — ————. — Influence of bacille Calmette-Guérin infection on polyoma in hamsters and mice. Cancer Res., 26: 585-589, 1966.
- 47 — LI, M. C., HERTZ, R. and BERGENTHAL, D. M. — Therapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors with folic acid and purine antagonists. New Eng. J. Med., 259:66-74, 1958.
- 48 — LI, M. C., HERTZ, R. and SPENCER, D. B. — Effect of Methotrexate therapy upon choriocarcinoma and chorioadenoma. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 93:361-66, 1956.
- 49 — LUCHERINI, T. — Tentativo di cura della leucemia con inoculazione di sangue infetto di "*Plasmodium vivax*". Il Policlinico, 32:1745-47, 1925.
- 50 — LUISI, A., DE PADUA BERTELLI, A., MACHADO, J. C., and ACHE DE FREITAS, J. P. — "Linfoma Africano" em Crianças Brasileiras. Revista Brasileira de Cirurgia, 49:280-95, 1965.
- 51 — MACFIE, J. W. S. — An observation on the effect of malaria in leukemia. Ann. Trop. Med., 13:347, 1920.
- 52 — NADEL, E. M., GREENBERG, J., and COATNEY, G. R. — The effect of malaria (*Plasmodium Berghei*) on leukemia L1210 in mice. J. Infec. Dis., 95: 109-113, 1954.
- 53 — NGU, V. A. — The African lymphoma (Burkitt tumour): Survivals exceeding two years. Brit. J. Cancer, 19:101-07, 1965.
- 54 — ————. — Clinical evidence of host defences in Burkitt Tumour. IN: J. H. Burchenal, and D. Burkitt, (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor. OP. CIT.
- 55 — ————. — Clinical experience in the therapy of Burkitt tumour. IBID.
- 56 — O'CONNOR, G. T. and DAVIES, J. N. P. — Malignant tumors in African children; with special reference to malignant lymphoma. J. Pediat., 56:526-35, 1960.
- 57 — O'CONNOR, G. T., and RABSON, A. S. — Herpes-like particles in an American lymphoma (preliminary note). J. Natl. Cancer Inst., 35:839, 1965.
- 58 — O'CONNOR, G. T., RAPPAPORT, H. and SMITH, E. B. — Childhood lymphoma resembling "Burkitt tumor" in the United States. Cancer, 18:411-17, 1965.
- 59 — OETTGEN, H. F., BURKITT, D., and BURCHENAL, J. H. — Malignant lymphoma involving the jaw in African children: Treatment with Methotrexate. Cancer, 16:616-25, 1963.
- 60 — OETTGEN, H. F., CLIFFORD, P., and BURKITT, D. — Malignant lymphoma involving the jaw in African children: Treatment with alkylating agents and Actinomycin D. Cancer Chemother. Rept., 28:25-35, 1963.
- 61 — OLD, L. J., BENACERRAF, B., CLARKE, D. A., CARSWELL, E. A. and STOCKERT, E. — The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. Cancer Res., 21: 281-1300, 1961.
- 63 — OLD, L. J., CLARKE, D. A., and BENACERRAF, B. — Effect of Bacillus Calmette-Guérin (B.C.G.) infection on transplanted tumours in the mouse. Nature, 184:291-92, 1959.
- 63 — ————. — Mengo virus infection in bacillus Calmette-Guérin or Zymosan treated mice. Fed. Proc., 19:208, 1960.
- 64 — ————. — Reticuloendothelial function in various strains of mice. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 3:139, 1960.
- 65 — ————. — and GOLDSMITH, M. The reticuloendothelial system and the neoplastic process. Ann. N. Y. Acad. Sci., 88:264-80, 1960.
- 66 — OSUNKOYA, B. O. — The effect of some anticancer agents and steroid hormones on Burkitt cells in vitro. IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt, (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor. OP. CIT.

- 67 — ————. — The preservation of Burkitt tumour cells at moderately low temperature. *Brit. J. Cancer*, 19:749-53, 1965.
- 68 — ————. — Various aspects of the Burkitt tumor cell in tissue culture with reference to host defenses. IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt, (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor. *OP. CIT.*
- 69 — PULVERTAFT, R. J. V. — A study of malignant tumours in Nigeria by short term tissue culture. *J. Clin. Path.*, 18:261-73, 1965.
- 70 — ————. — The use of tissue culture in the diagnosis of Burkitt's tumour. IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor, *OP. CIT.*
- 71 — ROSENOW, G. — Ueber die Behandlung der leukämie mit impfmalaria. *Deutsche Med. Wchschr.*, 53:617, 1927.
- 72 — ————. — Ueber die Beziehungen der malaria zur leukämie. *Ibid.*, 44: 1070, 1918.
- 73 — SCHUPFER, R. — Studi sulle leucemie e sulle pseudoleucemie. Nota II. L'influenza che sulla leucemia esercitano le malattie infettive intercorrenti ed il suo valore terapeutico. *Il Policlinico*. 12:145, 1905.
- 74 — SELAWRY, O. S. — Therapeutic index of methotrexate as related to dose schedule and route of administration in children with acute lymphocytic leukemia. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 6: 57, 1965.
- 75 — SKIPPER, H. E. — Some types of quantitative and kinetic information worth seeking and considering in the design of therapeutic trials. IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt, (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor, *OP. CIT.*
- 76 — SKIPPER, H. E., SCHABEL, F. M. Jr., and WILCOX, W. S. — Experimental evaluation of potential anti-cancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. *Cancer Chemother. Rep.*, 35:1-111, 1964.
- 77 — STANLEY, N. F., WALTER, M. N. I., LEAK, P. J. and KEART, D. — The association of murine lymphoma with Reovirus type 3 infection. *Proc. Soc. Exper. Bio. Med.*, 121:90-96, 1966.
- 78 — STEINKULLER, C. and BURTON, D. — Immunology of spontaneous mammary tumors in mice. Mode of action of a tumor protective fraction of tubercle bacilli (MER). *Proc. Am. Assoc. Res.*, 7:68, 1966.
- 79 — STEWART, S. E., LOVELACE, E., WHANG, J. and LANDON, J. — A herpeslike virus in lymphoma cells in culture. *Ibid.*, 6:62, 1965.
- 80 — TEN SELDAM, R. E. J., COOKE, R. and ATKINSON, L. — Childhood lymphoma in the territories of Papua and New Guinea. *Cancer*, 19:437-46, 1966.
- 81 — TRAGER, W. — Inhibition of Tumor I of chickens by simultaneous infection with the malaria parasite *Plasmodium Lophurae*. *Fed. Proc.*, 10:373-74, 1951.
- 82 — ————. — and MCGHEE, R. B. — Inhibition of chicken Tumor I by plasma from chickens infected with avian malaria parasite. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 83:349-52, 1953.
- 83 — WEIGLE, W. O. — Induction and termination of immunologic tolerance to protein antigens. *Fed. Proc.*, 25:160-164, 1966.
- 84 — WEISS, D. W., BONHAG, R. S., DeOME, K. B. — Protective activity of fractions of tubercle bacilli against isologous tumours in mice. *Nature*, 190:889-91, 1961.
- 85 — WILLIAMS, M. C. — Implications of the geographical distribution of Burkitt's lymphoma. IN: J. H. Burchenal and D. Burkitt, (eds.), Treatment of Burkitt's Tumor, *OP. CIT.*
- 86 — WRIGHT, D. H. — The gross and microscopic pathology of Burkitt's tumor.
- 87 — ZIEGLER, J. L. and MILLER, D. G. — Lymphosarcoma resembling the Burkitt tumor in a Connecticut girl. Submitted to J.A.M.A., 1966.
- 88 — ZUELZER, W. W. — Implications of long-term survival in acute stem cell leukemia of childhood treated with composite cyclic therapy. *Blood*, 24: 477-94, 1964.