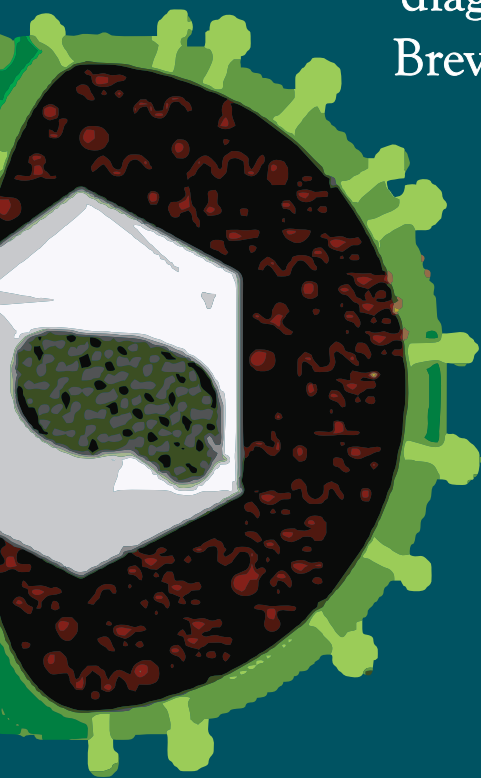


Organizadoras
Renata Pereira Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano

Vírus Epstein-Barr

etioepidemiologia,
fisiopatologias associadas e
diagnósticos
Breve revisão



Renata P. Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano
Kellen Cristina T. Costa
Ana Beatriz A. de Moraes

Renata Pereira Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano
(Organizadoras)

Vírus Epstein-Barr
etioepidemiologia, fisiologia
associadas e diagnósticos
breve revisão

1ª Edição


Edibrás
Gráfica e Editora

Fone: (34) 3236-1761
contato@graficaedibras.com.br

Uberlândia - MG - Brasil

2018

©2018
Renata Pereira Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano

Vírus Epstein-Barr etioepidemiologia, fisiologia associadas e diagnósticos breve revisão
Diagramação e Arte-Final: Wellington Donizetti

CORPO EDITORIAL:

Graziela Giusti Pachane (Doutora em Educação pela UNICAMP)
Juraci Lourenço Teixeira (Mestre em Química pela UFU)
Kenia Maria de Almeida Pereira (Doutora em Literatura pela UNESP)
Mara Rúbia Alves Marques (Doutora em Educação pela UNIMEP)
Roberto Valdés Pruentes (Doutor em Educação pela UNIMEP)
Orlando Fernández Aquino (Doutor em Ciências Pedagógicas pela ISPVC - Cuba)
Luiz Bezerra Neto (Doutor em Educação pela UNICAMP)
Irley Machado (Doutora pela Université Paris III - Sorbonne Nouvelle)
Vitor Ribeiro Filho (Doutor em Geografia pela UFRJ)
Lidiane Aparecida Alves (Mestre em Geografia pela UFU)
Fernanda Arantes Moreira (Mestre em Educação pela UFU)
Bruno Arantes Moreira (Doutor em Engenharia Química pela UFU)
Renata Pereira Alves Balvedi (Doutora em Bioquímica e Pós-Doutora em Nanobiotecnologia pela UFU)

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
EDITORA EDIBRÁS, MG, BRASIL

B171v	BALVEDI, Renata Pereira Alves / CAETANO, Larissa Pereira / Vírus Epstein-Barr etioepidemiologia, fisiopatologias associadas e diagnósticos breve revisão Uberlândia: Edibrás, 2018. 54p.: il. ISBN: 978-85-67803-75-3 1. Vírus Epstein-Barr. 2. Fisiopatologias. 3. Genética. 4. Bioquímica. I. BALVEDI, Renata Pereira Alves II. CAETANO, Larissa Pereira III. Título
-------	---

CDD 570

É proibida a reprodução total ou parcial.
Impresso no Brasil / *Printed in Brasil*
Conteúdo dos artigos é de responsabilidade dos autores.

AUTORES



Renata Pereira Alves Balvedi

Graduada em Ciências Biológicas e Odontologia, Mestre em Odontologia, Doutoranda em Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia.

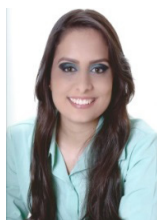
Email: renataalvesbalvedi@hotmail.com



Larissa Pereira Caetano

Graduada em Biotecnologia e foi aluna de Iniciação Científica pela Universidade Federal de Uberlândia.

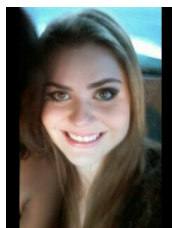
Email: larissa_biotec3@hotmail.com



Kellen Cristina Torres Costa

Graduada em Biotecnologia e foi aluna de Iniciação Científica pela Universidade Federal de Uberlândia.

Email: costakellen@yahoo.com.br



Ana Beatriz Almeida de Moraes

Graduada em Biotecnologia pela Universidade Federal de Uberlândia.

Email: anabmoraes31@hotmail.com

APRESENTAÇÃO

Apresentamos a primeira edição do *EBV – breve revisão etioepidemiológica, fisiopatológica e desordens associadas*. Aqui trouxemos informações históricas etioepidemiológicas da descoberta do EBV que em 1920, Sprunt & Evans, designaram a doença mononucleose infecciosa para o curso clínico e Downey identificou as alterações morfológicas nos linfócitos; em 1932, Paul e Bunnell observaram anticorpos heterofilos e estudos iniciais sobre a fisiopatologia associadas iniciaram no final dos anos 1950 quando foram descritos pela primeira vez um linfoma que incidia principalmente em crianças em certas regiões na África. O EBV foi originalmente descrito por Epstein e colaboradores (1964) a presença do EBV em cultivo in vitro de amostras suspeitas de linfomas enviadas por Burkitt. Henle & Henle (1966) realizaram os primeiros estudos diagnósticos com a utilização da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para análise do EBV. Há mais de 40 anos estudos mostram as fisiopatologias e desordens associadas ao vírus, porém em estudos individualizados focando patologia, genética, imunohistoquímica, diagnóstico. Assim, este livro não é um livro que possa um compêndio, mas sim um resumo norteador das principais características de um vírus que estima-se que mais de 90% dos adultos foram infectadas com pelo menos um tipo viral. As referências bibliográficas, figuras e tabelas selecionadas, no capítulo ou ao final de cada capítulo, contêm referências de artigos publicados nas revistas científicas que podem ser acessadas na internet e as referências cruzadas podem dar ao leitor uma cobertura mais ampla do assunto. Queremos expressar nossos sinceros agradecimentos a todos que nos ajudaram na preparação deste livro incluindo nossos familiares. Por fim, temos enorme dívida com PhD. Epstein e colaboradores pela visão determinística de pesquisa que nos serve de inspiração e foram os pioneiros nesta pesquisa.

Sumário

Capítulo 1.....9

Histórico, Classificação e estrutura do Vírus Epstein-Barr

Renata Pereira Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano
Kellen Cristina Torres Costa

Capítulo 2.....21

Formas de transmissão do vírus Epstein-Barr

Larissa Pereira Caetano
Ana Beatriz Almeida de Moraes
Renata Pereira Alves Balvedi

Capítulo 3.....31

Fisiopatologias associadas ao vírus Epstein-Barr

Kellen Cristina Torres Costa
Renata Pereira Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano

Capítulo 4.....45

Diagnósticos do vírus Epstein-Barr

Ana Beatriz Almeida de Moraes
Kellen Cristina Torres Costa

CAPÍTULO 1

Histórico, Classificação e estrutura do Vírus Epstein-Barr

*Renata Pereira Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano
Kellen Cristina Torres Costa*

1. HISTÓRICO

Em 1920, Sprunt & Evans, designaram o termo mononucleose infecciosa para o curso clínico com regressão espontânea de um caso de leucemia aguda com presença de células blásticas. No mesmo período Downey identificou as alterações morfológicas nos linfócitos; e em 1932, Paul e Bunnell observaram que os anticorpos humanos se aglutinavam às hemácias de outras espécies animais – anticorpos heterófilos – permitindo elevada precisão diagnóstica (KIEFF & RICKINSON, 2007).

No final dos anos 1950 foi descrito pela primeira vez um linfoma que incidia principalmente em crianças em certas regiões na África (BURKITT, 1958). O EBV foi originalmente descrito por Epstein e colaboradores (1964) a partir de investigações realizadas em cultivo *in vitro* de amostras suspeitas de linfomas enviadas por Burkitt, nos quais através da microscopia eletrônica, foi possível identificar a presença de um vírus com morfologia típica dos vírus do grupo Herpes.

Henle & Henle (1966) realizaram os primeiros estudos com a utilização da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para análise do EBV. Em 1968, esses autores descreveram a associação do vírus à mononucleose infecciosa e confirmado por outros estudos (CANDEIAS & PEREIRA, 1970; WOLF *et al.*, 1984).

Segundo Henle *et al.* (1969) o EBV foi identificado como sendo o agente etiológico causador da mononucleose infecciosa. Quanto a incubação existente, Kieff & Rickinson (2007) avaliaram

que esta poderia manifestar de quatro a seis semanas antes da infecção primária e que a transmissão ocorre, em sua maioria, pelo contato direto com as secreções (orofaringe) ou indiretamente por manipulação de objetos pessoais contaminados pelo vírus.

Estudos paralelos mostraram que a infecção primária pelo EBV geralmente se manifesta na adolescência; e quando a infecção ocorre na fase adulta, o EBV pode desenvolver uma doença proliferativa (EVANS, 1972).

2. HERPESVIRIDAE

Herpesviridae é uma família de vírus cujo material genético é constituído por DNA. Estes vírus causam doenças em animais, mas de forma alarmante nos seres humanos (FUCHS *et al.*, 2007; KUHN *et al.*, 2010)

O nome dado à família destes vírus é derivado da palavra grega *herpein* (“rastejar”), referindo-se ao estado latente e infecções recorrentes típicas. Estima-se que mais de 90% dos adultos foi infectado com pelo menos um tipo viral (GUERRA *et al.*, 2013).

Os vírus segundo Sistema de Classificação de Baltimore, são divididos em sete grupos (Tabela 1). No Grupo 1 estão os vírus dsDNA que possuem material genético constituído por DNA fita dupla e apresentam genoma circular ou linear, com tamanho variando de 5 a 1180 Kb. Os maiores genomas virais conhecidos até então são encontrados em componentes deste grupo. De todos os vírus dsDNA, apenas os da família *Polydnnaviridae* é a que possui material genético segmentado, já os membros das outras famílias possuem partículas virais que levam apenas uma única molécula de DNA fita dupla, responsável pela codificação dos genes contidos no genoma viral (ACHESON, 2007; SSIB, 2011).

Tabela 1: Sistema de classificação de Baltimore para vírus.

SISTEMA DE CLASSIFICAÇÃO DE BALTIMORE	
GRUPO I	Vírus dsDNA
GRUPO II	Vírus ssDNA
GRUPO III	Vírus dsRNA
GRUPO VI	Vírus (+)ssRNA
GRUPO V	Vírus (-)ssRNA
GRUPO VI	Vírus ssRNA-RT
GRUPO VII	Vírus dsDNA-RT

Fonte: ICTV Master Species list 2009

Os vírus da família *Herpesviridae* têm em comum, entre si, a capacidade de causar a infecção primária, e permanecer latente e assim reativar e/ou induzir a formação de tumores (KIEFF & RICKINSON, 2007)

Na Subfamília *Alfaherpesvirinae*, existe o gênero *Simplex virus*, com as espécies HSV-1 e HSV-2. O ciclo lítico destes vírus ocorre em células epiteliais e o ciclo lisogênico em neurônios. O vírus HSV-1 geralmente apresenta sintomatologia associada às feridas faciais, principalmente em lábios na época de inverno ou em períodos de estresse do infectado. O HSV-1 é encontrado em 70% dos cérebros analisados em doentes com Alzheimer (LÖVHEIM *et al.*, 2014) e HSV-2 está associada ao herpes genital (BAETEN *et al.*, 2008). Mesmo não sendo simples, o Vírus da Varicela-zóster (VZV, HHV-3, Human Herpesvirus-3), também conhecido por catapora-zóster no Brasil também faz parte desta subfamília (NAGATA *et al.*, 2012).

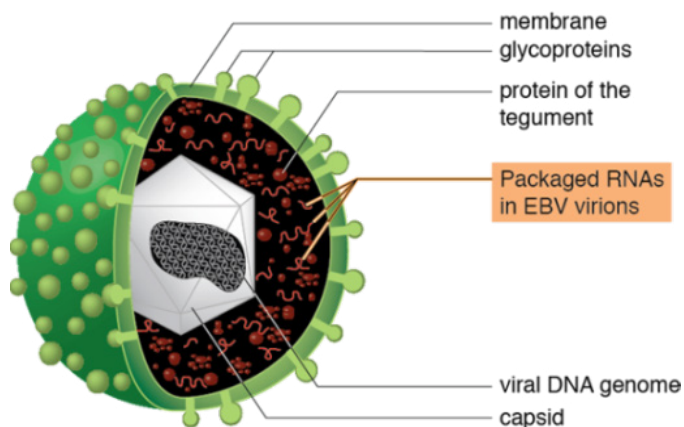
Na subfamília *Betaherpesvirinae* há as espécies HHV-5, HHV-6 e HHV-7. O HHV-5 (HCMV, Human Cytomegalovirus) é o citomegalovírus que ao ser transmitido ao feto é fatal (BHIMRAO *et al.*, 2015). Quando crianças ou adultos são acometidos ocorre febre e pneumonia e hepatite. HHV 6 e 7 estão associados a doença infantil infecciosa roséola e infecção no sistema nervoso central (DEWHURST *et al.*, 2004; HALL *et al.*, 2006)

Na subfamília *Gamaherpesvirinae* há HHV-4 e HHV-8. HHV-4 ou Vírus Epstein-Barr associado a doença do beijo ou mononucleose infecciosa. Envolvido na patogênese de alguns cânceros, como o linfoma de Burkitt, o carcinoma nasofaríngeo e a doenças autoimunes (HADEL *et al.*, 2010; RAJČANI *et al.*, 2014). O HHV-8 ou KSHV, Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus) – é o vírus que pode causar sarcoma de Kaposi (hemangiossarcoma) tumor maligno de vasos sanguíneos que acomete em maior frequência pacientes imunocomprometidos (KEDES *et al.*, 1996).

3. ESTRUTURA

A partícula viral extracelular possui diâmetro de cerca de 150-180 nanômetros (nm). Está cercada por um envelope que contém projeções glicoproteicas externas, de cerca de 8nm de comprimento (Figura 1). O nucleocapsídeo icosaédrico tem 162 capsômeros e abriga um genoma viral de DNA de aproximadamente 172 mil pares de bases (pb), com 60% do seu total composto de guanina e citosina; que codificam aproximadamente 100 proteínas virais (BAER *et al.*, 1984; CRUCHLEY *et al.*, 1997; KIEFF & RICKINSON, 2007; MATSUURA *et al.*, 2010).

Figura 1.1: Esquema simplificado da estrutura do EBV



Fonte: www.helmholtz-muenchen.de

Ressalta-se que as proteínas latentes incluem os seis antígenos nucleares (EBNAs 1, 2, 3A, 3B e 3C, e EBNA-LP) e as três proteínas de membrana latentes (LMPS 1, 2A e 2B). EBNA-LP é transcrito a partir de um número variável de exons repetitivos. LMP2A LMP2B e são compostas de vários exons, que estão localizados em ambos os lados da região de repetição terminal (TR), que é formado durante a circularização do DNA linear para produzir o epissoma viral. Na figura 2, os fragmentos BamHI são nomeados de acordo com o tamanho, sendo o fragmento nomeado pela letra “A” ser o maior fragmento e as letras minúsculas indicam os menores fragmentos. Note-se que as proteínas LMP2 são produzidos a partir de RNAm através de splicing que as repetições terminais (TRs) no genoma de EBV circularizado. É possível observar por micrografia eletrônica o virião do vírus de Epstein-Barr (EBV). Atualmente já se conhece a localização e a transcrição dos genes latente do EBV no dsDNA epissomal do vírus. A origem de replicação (OriP) é identificado como também os exons que codificam para cada uma das proteínas latentes transcritas.

Os RNAs EBER1 e EBER2 possui sua transcrição como uma característica consistente de infecção latente pelo EBV. A latência III (Lat III), na qual todas as EBNAs são transcritos (a partir de qualquer Cp ou Wp promotor) e codificados por mRNAs individuais que são gerados por *splicing* diferencial do mesmo transcrito primário de comprimento. A transcrição EBNA1, que se origina a partir do promotor Qp durante Lat I e Lat II. Transcrições da região de BamHIA pode ser detectada durante a infecção latente, mas nenhuma proteína proveniente desta região tem sido definitivamente identificada. As localizações das regiões de codificação e BARF0 BARF1 são identificadas. A Localização e leitura para as proteínas latentes do EBV no mapa de restrição BamHI-endonucleoses do genoma do protótipo B95.8. também é possível (YOUNG & RICKINSON, 2004).

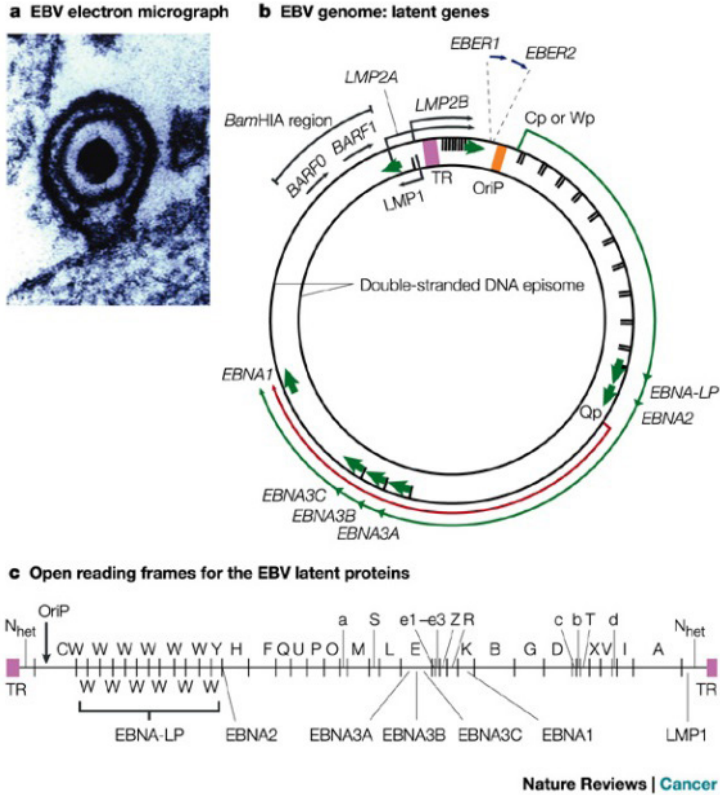


Figura 1.2: a) Microscopia Eletrônica do viriônio do vírus de EBV. b) Diagrama de localização e a transcrição dos genes latente do EBV. A origem OriP é mostrado em laranja. As setas grandes sólidas verdes representam os exons que codificam proteínas latentes. As setas azuis na parte superior representam RNAs EBER1 e EBER2. A seta verde exterior uma forma de latência conhecido como latência III. A seta curta interior representa a região de transcrição EBNA1. As localizações das regiões de codificação e BARF0 BARF1 são mostradas aqui. c) Localização de grelhas de leitura abertas para as proteínas latentes do EBV no mapa de restrição BamHI-endonucleases do genoma do protótipo B95.8. Fonte: Modificado Lawrence S. Young & Alan B. Rickinson (2004).

Herpesvírus entra na célula hospedeira de um processo que envolve a fusão das membranas virais e celulares. O aparelho é constituído por fusão do envelope da glicoproteína B (gB) e um complexo de glicoproteínas heterodimérica feita H e L. A

glicoproteína B é a mais conservada da glicoproteína envelope em herpesvírus humanos, e a estrutura de gB a partir do vírus Herpes simplex 1 (HSV-1) está disponível. Aqui, relatamos a estrutura cristalina do ectodomínio EBV gB secretada, que forma 16-nm de comprimento trímeros *spike-like*, estruturalmente homóloga aos trímeros da proteína de fusão G do vírus da estomatite vesicular (VSV). Análises estruturais comparativos de EBV gB e VSV G, que foi resolvido nas suas pré e pós-fusão estados, lançar luz sobre resíduos GB, podem estar envolvidos em mudanças de conformação e a fusão da membrana. Além disso, a estrutura de EBV gB revela que, apesar da conservação da sequência de gB de alta em vírus de herpes, as orientações relativas dos domínios individuais, as distribuições de carga superficial, e os detalhes estruturais do EBV gB diferir da proteína de HSV-1, indicando as regiões e os resíduos que pode ter um papel importante na entrada específica de vírus. (Figura 3) BACKOVIC *et al.*, 2008)

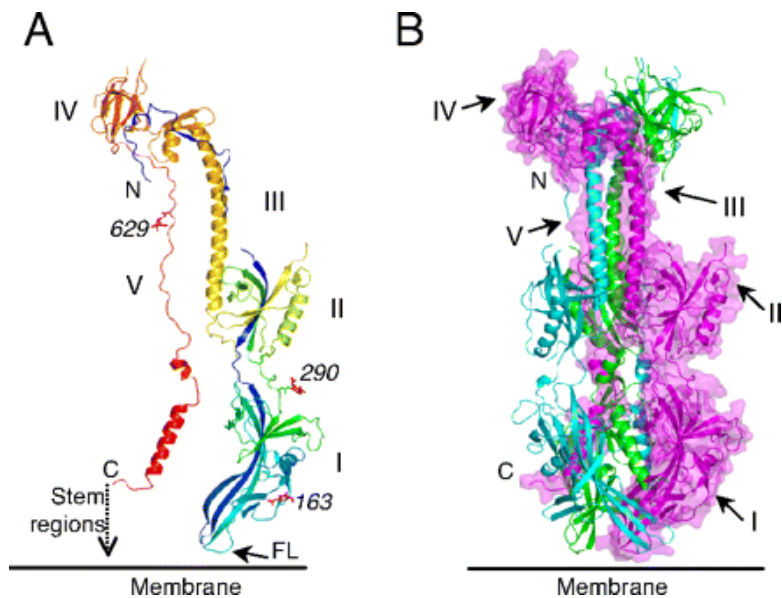


Figura 1.3: Estrutura do EBV gB ectodomínio. (A) A subunidade gB é colorida de azul para vermelho, a partir de N e C terminal, que são rotulados N e C, respectivamente. Os números indicam resíduos N-glicosiladas Asn, para que uma única molécula de NAG é modelado. FLs são marcados e apontam na mesma direcção que o terminal C de gB. (BACKOVIC *et al.*, 2008)

As proteínas gH e gL associam-se para formar um complexo heterodimérico, que é necessária para a fusão da membrana eficiente e também implicada na ligação directa a células epiteliais receptores celulares necessários para a entrada viral. Para ter uma visão sobre o papel mecanicista do GH / GL, determinamos a estrutura de cristal do complexo EBV gH / GL. A estrutura é composta de quatro domínios organizados ao longo do eixo mais longo da molécula. Comparações com homólogos HSV-2 GH / GL e estruturas gH vírus da pseudo parcial apoiar os limites de domínio de determinados para a estrutura EBV gH / GL e ilustrar diferenças significativas em ângulos de embalagem interdomain.

As subunidades gL e N-terminais de resíduos de gH formar um domínio globular em uma extremidade da estrutura, implicados nas interações com o gB e activação de fusão de membrana. O domínio C-terminal de gH, proximal à membrana virai, também está implicada na fusão da membrana. A estrutura gH / gL localiza um motivo de ligação a integrina, implicada na invasão das células epiteliais, em um circuito de destaque na região central da estrutura. Várias regiões do GH / GL, incluindo seus dois extremos, são funcionalmente importantes, de acordo com os múltiplos papéis do GH / GL na entrada de EBV. (Matsuura et al, 2010)

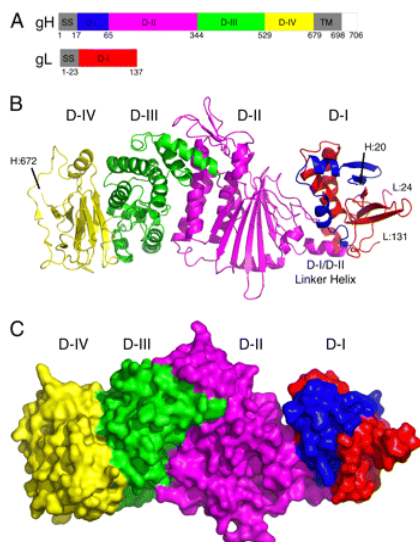


Figura 1.4: Estrutura do EBV GH e GL heterodimero: (A) Diagrama esquemático das estruturas de domínio EBV GH e GL. Os números de sequência são indicados abaixo; (B) da fita da estrutura EBV GH / GL. GH é de cor azul em DI, magenta no D-II, verde em D-III, e amarelo em D-IV. GL é de cor vermelha; (C) da superfície da estrutura de EBV GH / GL colorido pelo domínio como em B. (modificado: MATSUURA *et al.*, 2010)

Assim, ao conhecermos o histórico da descoberta e as tecnologias atuais utilizadas para aprofundar os conhecimentos sobre o EBV permitem que a etioepidemiologia, fisiopatologias associadas possam ser estudadas e terapêuticas preventivas/curativas sejam desenvolvidas.

Referências

ACHESON, N. H. **Fundamentals of Molecular Virology**. Chichester: Wiley, 2007.

BACKOVIC, M.; LONGNECKER, R.; JARDETZKY, T.S. Structure of a trimeric variant of the Epstein–Barr virus glycoprotein B. **PNAS** vol. 106, n.8, p. 2880–2885, 2008.

BAER, R.; BANKIER, A. T.; BIGGIN, M. D.; DEININGER, P. L.; FARRELL, P. J.; GIBSON, T. J.; HATFULL, G.; HUDSON, G. S.; SATCHWELL, S. C.; SÉGUIN, C.; TUFFNELL, P. S. & BARRELL, B. G. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein–Barr virus genome. **Nature** n. 310, p. 207 – 211, 1984.

BAETEN, J.M.; STRICK, L.B.; LUCCHETTI, A.; WHITTINGTON, W.L.H.; SANCHEZ, J.; COOMBS, R.W.; MAGARET, A.; WALD, A.; COREY, L.; CELUM, C. Herpes Simplex Virus (HSV)-Suppressive Therapy Decreases Plasma and Genital HIV-1 Levels in HSV-2/HIV-1 Coinfected Women: A Randomized, Placebo-Controlled, Cross-Over Trial. **The Journal of Infectious Diseases**. vol. 198, n. 12, p. 1804-1808, 2008.

BHIMRAO, S.K.; MAGUIRE, J.; GARNIS, C.; TANG, P.; LEA, J.; AKAGAMI, R.; WESTERBERG, B.D. Lack of Association between Human Herpesvirus and Vestibular Schwannoma Analysis of 121 Cases. **Otolaryngol Head Neck Surg** vol. 152, n.3, p.513-7, 2015

BURKITT DP. Sarcoma involving jaws in African children. **Br J Surg**, vol. 46, p. 218–23, 1958.

CANDEIAS, J.A.N.; PEREIRA, M.S. Pesquisa de anticorpos para o vírus EB em adultos e crianças. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 12, p. 333-338, 1970.

CRUCHLEY, A.T.; WILLIAM, D.M. Epstein-barr virus: biology and disease. **Oral Dis Suppl** n.1, p. 5156-63, 1997.

DEWHURST S. Human herpesvirus type 6 and human herpesvirus type 7 infections of the central nervous system. Herpes : **The Journal of the IHMF** vol. 11, n. 2, p. 105-111, 2004.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G., and BARR, Y. M.: Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **The Lancet**, n. 1, p. 702-703, 1964.

EVANS A. S. Clinical syndromes associated with EB virus infections. **Annals of Internal Medicine**, n. 18, p. 77-93, 1972

FUCHS, W.; GRANZOW, H.; KLUPP, B.G.; KARGER, A.; MICHAEL, K.; MARESCH, C.; KLOPFLEISCH, R.; METTENLEITER, T.C. Relevance of the interaction between alphaherpesvirus UL3.5 and UL48 proteins for virion maturation and neuroinvasion. **J Virol** n. 81, p. 9307-9318, 2007

GUERRA N.L.; de SOUZA, V.L.V.; SANTOS, C.A.; UNES, V.A.; LOTUFO, M.A. Herpes. **Revista Saúde** vol. 14, n. 6, 2012.

HALL, C.B.; CASERTA, M.T.; SCHNABEL, K.C.; MCDERMOTT, M.P.; LOFTHUS, G.K.; CARNAHAN, J.A.; GILBERT, L.M.; DEWHURST, S. Characteristics and Acquisition of Human Herpesvirus (HHV)-7 Infections in Relation to Infection with HHV-6. **J Infect Dis**. vol. 193, n. 8, p. 1063-1069, 2006.

HANDEL, A.E.; WILLIAMSON, A.J.; DISANTO, G.; HANDUNNETHL, L.; GIOVANNONI, G.; RAMAGOPALAN, S.V. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. **Plos one** vol. 5, n. 9, p.12496, 2010.

HENLE, G., HENLE, W., CLIFFORD, P., DIEHL, V., KAFUKO, G.W., KIRYA, B.G.; KLEIN, G.; MORROW, R.H.; MUNUBE, G.M.; PIKE, P.M.; TUKEI, P.M.; ZIEGLER, J.L. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. **Journal National Cancer Institute**, n. 43, p. 1147-1157, 1969.

HENLE, G. AND HENLE, W. Immunofluorescence in Cells Derived from Burkitt's Lymphoma. **J Bacteriol.** vol.91, n. 3, p. 1248–1256, 1966.

KEDES, D.H.; OPERSKALSKI, E.; BUSCH, M.; KOHN, R.; FLOOD, J. & GANEM, D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): Distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. **Nature Medicine** n. 2, p. 918 – 924, 1996.

KIEFF, E.D.; RICKINSON, A.B. Epstein Barr virus and Its replication In: Fields Virology. 5th. knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strus, S.S. (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2601-2610, 2007.

KUHN, J.; LEEGE, T.; GRANZOW, H.; FUCHS, W.; METTENLEITER, T.C.; KLUPP, B.G. Analysis of pseudorabies and herpes simplex virus recombinants simultaneously lacking the pUL17 and pUL25 components of the C-capsid specific component. **Virus Res** n. 153, p. 20-28, 2010.

LÖVHEIM H.; GILTHORPE J.; ADOLFSSON R.; NILSSON L.G.; ELGH, F. Reactivated herpes simplex infection increases the risk of Alzheimer's disease. **Alzheimer's & Dementia.** n.14, p. 2421-2, 2014.

MATSUURAA, H.; KIRSCHNERB, A.N.; LONGNECKER, R. AND JARDETZKY, T.S. Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. **PNAS** vol. 107, n. 52, p. 22641–46, 2010.

METTENLEITER et al. **Animal Viruses: Molecular Biology**. Caister Academic Press, 2008. Capítulo: Molecular Biology of Animal Herpesviruses.

NAGATA, K.; MARUYAMA, K.; UNO, K.; SHINOMIYA, K.; YONEDA, K.; HAMURO, J.; SUGITA, S.; YOSHIMURA, T.; SONODA, K.; MOCHIZUKI, M.; KINOSHITA, S. Simultaneous Analysis of Multiple Cytokines in the Vitreous of Patients with Sarcoid Uveitis. Invest. Ophthalmol. **Vis. Sci.** vol. 53, n. 7, p. 3827-3833, 2012.

RAJČÁNI J, SZENTHE K, DURMANOVÁ V, TÓTH A, ASVÁNYI B, PITLIK E, STIPKOVITS L, SZATHMARY S. Epstein-Barr virus (HHV-4) inoculation to rabbits by intranasal and oral routes results in subacute and/or persistent infection dissimilar to human disease. **Intervirology** vol.57, n. 5, p. 254-269, 2014.

SIB SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. ViralZone: dsDNA. Disponível em: <http://expasy.ivec.org/viralzone/all_by_species/236.html>. Página visitada em 02 de abril de 2011.

WOLF, H., MARGRET, H., EBERHERD, W. Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. **Pediatric Infectious Diseases**, n.51, p. 795-798, 1984.

YOUNG, L. S. & RICKINSON A. B. Epstein-Barr virus: 40 years on **Nature Reviews Cancer** n. 4, p. 757-768, 2004.

CAPÍTULO 2

Formas de transmissão do vírus Epstein-Barr

*Larissa Pereira Caetano
Ana Beatriz Almeida de Moraes
Renata Pereira Alves Balvedi*

1. TRANSMISSÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR

A princípio, estudos sugeriam que o sítio primário da infecção com vírus Epstein-Barr (EBV) ocorria com a replicação do vírus nas células epiteliais para posteriormente infectar células B (SIXBEY *et al.*, 1983). Estudos mais avançados propuseram que os locais de persistência do EBV, no indivíduo, são de fato as células B (BABCOCK *et al.*, 1998, (YOUNG & RICKINSON, 2004).

O EBV é transmissível pela saliva e fluidos corporais que em contato com a mucosa infecta inicialmente as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, onde frequentemente ocorre replicação. Posteriormente, os vírus alcançam tecidos linfáticos adjacentes e infectam linfócitos B através da ligação entre a glicoproteína viral gp350/220 e o receptor CD21 dessas células de defesa. Após essa associação, o vírus penetra nos linfócitos B por fusão do envoltório com a membrana celular e o capsídeo é então liberado no citoplasma. O genoma antes linear é transportado para o núcleo tornando-se circular, permanecendo em estado latente, sob a forma de DNA episomal extracromossômico. Os linfócitos B infectados podem disseminar para outros tecidos linfóides, entretanto é importante ressaltar que partículas virais devem estar disponíveis nas glândulas salivares para que seja possível a sua transmissão, como mostra a Figura 2.1 (Modificado LIMA & RABENHORST, 2006).

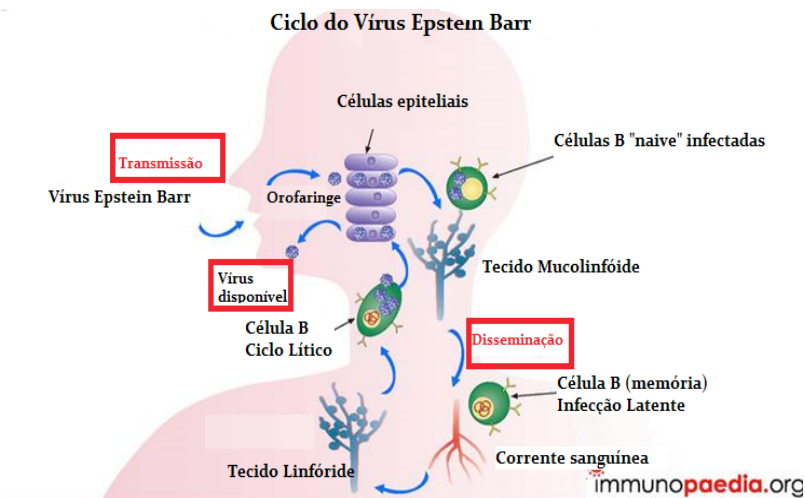


Figura 2.1: Representação do ciclo do vírus Epstein-Barr. Fonte: Adaptado de <http://www.immunopaedia.org.za/typo3temp/pics/7d1934a073.jpg>.

O genoma viral pode passar por duas fases na célula hospedeira: os ciclos de vida lítica e o lisogênio ou latente. Em ambos os casos, o vírus utiliza a maquinaria da célula hospedeira para efetuar a replicação contínua do seu material genético, ou seja, a replicação do EBV na célula depende inteiramente de ferramentas de replicação da célula hospedeira. A diferença principal dos ciclos de vida é que no período de latência, o vírus permanece quiescente dentro dos linfócitos, sem destruir tais células. Em contrapartida, no ciclo lítico há ocorrência de lise celular, libertando os vírus remanescentes para que estes atinjam novos tecidos e sejam capazes de promover a infecção em mais células (COHEN, 2000; YOUNG, DAWSON & ELIOPOULOS, 2000.)

Durante as infecções latentes, é possível verificar a expressão de alguns genes virais que codificam seis proteínas conhecidas como antígenos nucleares do EBV, como descrito nos trabalhos de Ribeiro-Silva & Zucoloto (2003) e Young & Rickinson (2004):

- EBNA-1: a proteína do antígeno nuclear 1 liga-se ao DNA do hospedeiro fazendo com que o genoma permaneça na célula infectada; portanto desempenha um papel crucial na manutenção

da infecção latente pelo EBV. O EBNA-1 é essencial para a replicação do genoma viral, sendo um regulador chave na transcrição dos genes latentes.

- EBNA-2: o antígeno nuclear 2 aumenta a expressão das proteínas celulares que contribuem para o crescimento das células B. Ou seja, o antígeno EBNA-2 é crucial para a proliferação celular das células-alvo infectadas.
- EBNA-3: a família EBNA-3 também parece ter importante papel na transformação de linfócitos B, já que está envolvido na transcrição de genes essenciais dessas células.
- EBNA-4, EBNA-5, EBNA-6: proteínas associadas à ativação ou inibição de genes de interesse.

Além dos EBNA's, dois tipos de RNA não traduzido (EBER's) e três proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-2A, LMP-2B) também ganham destaque pelo controle gênico, permitindo ora o estado de latência do vírus ora a sinalização do ciclo lítico (TAKACS *et al.*, 2010).

Acredita-se que os EBER's não codificam proteínas, mas podem atuar como oncogenes, além de bloquearem a apoptose. As proteínas latentes de membrana (LMP's) parecem estar relacionadas à ativação de genes necessários para a proliferação de linfócitos, o que torna um indicativo de que tais participam do processo de transformação neoplásica (RIBEIRO-SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

Dessa forma, quando o EBV está associado a linfomas, a proliferação induzida pelo vírus é uma etapa de um processo com múltiplos momentos de transformação neoplásica. Em muitos tumores que contém o EBV, as LMP's simulam os membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), transmitindo sinais de promoção do crescimento, principalmente no sistema linfoproliferativo (OLIVEIRA *et al.*; 2012).

A Tabela 1 sintetiza os genes do EBV que são expressos em estado de latência, bem como às respectivas doenças que podem ser originadas pela correspondente expressão. O vírus estabelece uma relação de latência com o organismo infectado associado ao seu potencial oncogênico (YOUNG & RICKINSON, 2004), entretanto os detalhes acerca do seu papel na tumorigênese humana e as patologias associadas serão descritos minuciosamente no capítulo seguinte.

Tabela I: Tipos de expressão dos genes latentes, do vírus Epstein-Barr

Latência	EBNA1	EBNA2	EBNA3	LMP1	LMP2	EBER	Doença
Tipo 1	+	-	-	-	-	+/-	Linfoma de Burkitt. Carcinoma mamário.
Tipo 2	+	-	-	+	+	+	Carcinoma de nasofaringe. Doença de Hodgkin . Linfoma T.
Tipo 3	+	+	+	+	+	+	Doenças linfoproliferativas .Mononucleose infecciosa.
Tipo 4	-	-	-	+	+	+	Portador saudável.

Legenda: EBNA, antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr; LMP, proteína latente de membrana; EBER RNA, codificado do vírus Epstein-Barr. + expressa o gene, - não expressa o gene, +/- pode ou não expressar o gene.

Fonte: Ribeiro-Silva & Zucoloto (2003).

Tendo como base os ciclos de vida concomitante aos principais genes expressos pelo vírus Epstein-Barr, podemos esclarecer todo o processo de infecção do EBV. Abaixo apresentamos uma figura esquemática (Figura 2.2) elucidando as principais etapas de infecção do Epstein-Bar:

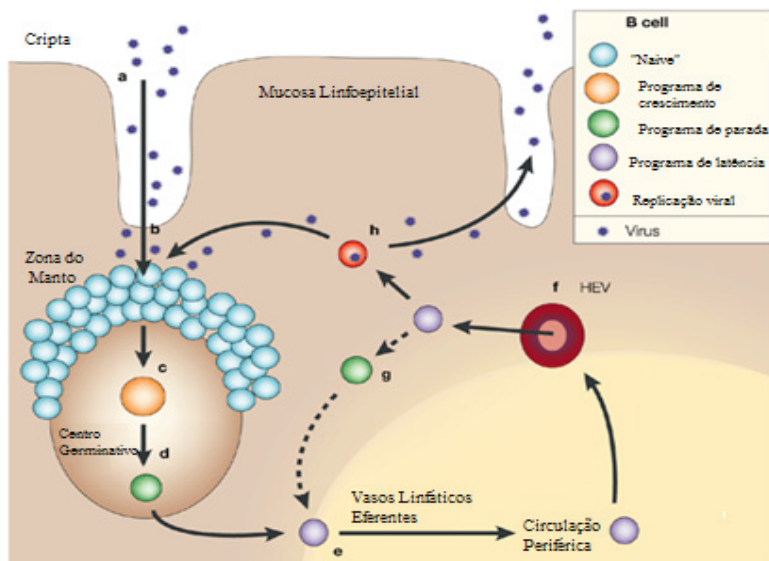


Figura 2.2: Esquemática do processo de infecção do EBV: a) O vírus entra por meio da saliva em estruturas linfopiteliais; b) atravessa a barreira epitelial; c) infecta as células B “naive” (linfócitos que ainda não foram expostos à antígenos) e promove a expressão do programa de crescimento do EBV sob a regulação do antígeno

nuclear 2 (EBNA-2). d) O crescimento é estagnado pelo desligamento do EBNA-2; e) Na ausência do antígeno 2 há expressão da proteína de membrana latente 1 (LMP-1). e) Os vírus no estado de latência presentes nas células de memória entram na circulação periférica por meio dos vasos linfáticos eferentes. f) As células de memória podem entrar novamente na mucosa e, g) a partir de então expressam proteínas que proporcionam os sinais necessários para a sobrevivência a longo prazo das partículas virais. h) Por fim, parte das células infectadas inicia a replicação viral, podendo ocorrer o processo de evasão para outros tecidos. Fonte: <http://www.nature.com/nri/journal/v1/n1/images/nri1001-075a-f4.gif>.

2. MONONUCLEOSE INFECCIOSA

A mononucleose infecciosa (MI), popularmente conhecida como “Doença do Beijo”, caracteriza-se por uma patologia transmissível, causada por infecção primária pelo Epstein-Barr que afeta, principalmente, crianças e jovens (NAKAOKA *et al.*, 2013). A associação entre infecção por este vírus e mononucleose infecciosa foi claramente estabelecida em 1968 (COSTA & VALLADA, 2007).

Usualmente, a mononucleose infecciosa é assintomática, podendo permanecer durante toda a vida do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2012). No entanto, em casos de mononucleose sintomática os principais indícios consistem em febre glandular (sintoma predominante da infecção), dores de cabeça, inflamação na garganta que não melhora com o uso de antibióticos, inchaço dos gânglios linfáticos no pescoço e axilas e das amígdalas, entre outros. (BRASIL, 2010). A sintomatologia surge após período de incubação de quatro a oito semanas (NAKAOKA *et al.*, 2013).

Comumente a mononucleose é sindrômica e caracteriza-se pela tríade: febre elevada e prolongada, faringite ou amigdalite e adenopatias. Contudo, pode cursar com:

- Rash cutâneo (exantema): erupções cutâneas;
- Hepatoesplenomegalia: aumento do tamanho do fígado e baço;
- Linfonodomegalias: aumento do tamanho dos linfonodos;
- Linfocitose: aumento do número de linfócitos no sangue, especialmente linfócitos atípicos (Figura 2.3).

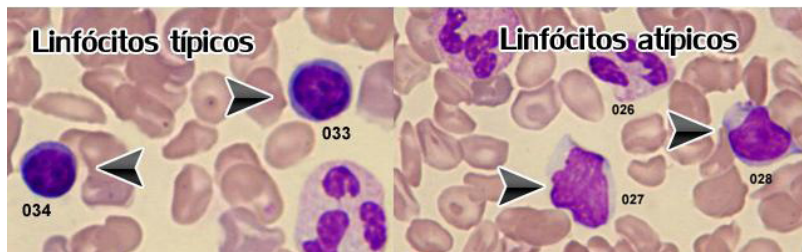


Figura 2.3: Comparação imunocitoquímica entre linfócitos normais ou típicos e linfócitos atípicos ou transformados. Fonte: http://ddcnovasperspectivas.blogspot.com.br/2014_01_01_archive.html

As complicações neurológicas são raras e incluem meningoencefalite, paresia de nervos cranianos, meningite, cerebelite aguda, encefalite, mielite transversa, entre outros processos inflamatórios no sistema nervoso (NAKAOKA *et al.*, 2013).

A MI apresenta distribuição universal, podendo ocorrer em qualquer faixa etária. Acredita-se que em países em desenvolvimento a infecção pelo vírus ocorra, predominantemente, na infância. Em contrapartida, em nações economicamente desenvolvidas, a infecção pelo EBV é mais provável que ocorra tardiamente, no período compreendido entre 10 e 30 anos (GROTTO *et al.*, 2003).

No mais, a prevalência da doença acomete especialmente indivíduos entre 15 e 25 anos de idade. O processo infeccioso ocorre em ambos os sexos, não há preferência por etnia e também não há predomínio sazonal (COHEN, 2008; SCHOOLEY, 2009).

A transmissão ocorre por via oral através de contato íntimo com a saliva de um hospedeiro infectado – motivo pelo qual é também denominada “Doença do Beijo”. Apesar de sua fácil transmissão, a mononucleose não é tão contagiosa e nem mesmo causa epidemias. Normalmente a enfermidade ocorre uma vez na vida de um indivíduo, mas casos de recorrência não devem ser descartados, especialmente em pacientes imunocomprometidos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Na infecção primária, o EBV infecta e multiplica nos linfócitos B, enquanto linfócitos T citotóxicos específicos são desenvolvidos e regulam a proliferação das células infectadas. Lembrando que anteriormente a permanência do vírus nas células-alvo (células B), pode ocorrer replicação do agente etiológico no epitélio orofaríngeo e, conseqüente liberação do vírus na saliva (GROSS, 2009).

Após a infecção e evasão das partículas virais, a proliferação das células infectadas resulta em aumento do tecido linfóide em diferentes regiões somáticas. Os títulos de imunoglobulina M (IgM) – anticorpos heterófilos produzidos pelas células infectadas – se elevam. Tais anticorpos heterófilos são células de defesa produzidas em resposta a antígenos pouco definidos, caracterizando-se por uma atividade multiespecífica (COSTA & VALLADA, 2007).

A imunidade celular é mais importante do que a resposta humoral no controle do processo infeccioso desencadeado pelo EBV. Na fase inicial da infecção, as células T supressoras, as células *natural killer* (NK) e as células T citotóxicas inespecíficas são importantes no controle da proliferação dos linfócitos B infectados pelo vírus. Em uma fase subsequente da infecção, ocorre a produção de células T citotóxicas HLA-restritas, as quais reconhecem os antígenos nucleares do EBV (anti-EBNA) e as proteínas latentes de membrana (LMP), bem como destroem as células infectadas. No entanto, se a imunidade mediada por células T for comprometida, tais células poderão proliferar (COSTA & VALLADA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A principal característica patológica da MI é a notável resposta proliferativa no âmbito do sistema mononuclear fagocitário, especialmente nos linfonodos. O baço é marcado pela infiltração de sua estrutura fibromuscular por células mononucleares, de modo que tanto a cápsula como as trabéculas são invadidas pelos linfócitos em proliferação. A medula óssea pode apresentar hiperplasia generalizada dos elementos eritróide, mielóide e megacariocítico (GROSS, 2009).

Existem outras enfermidades associadas ao vírus Epstein-Barr – além da MI –, dentre as quais se podem mencionar as doenças linfoproliferativas, descritas em pacientes com imunodeficiência congênita ou adquirida, incluindo enfermos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e naqueles receptores de transplantes de medula óssea ou de órgãos que estejam sendo tratados com imunossupressores (COHEN, 2008).

Referências

BABCOCK, G. J.; DECKER, L. L.; VOLK, M.; THORLEY-LAWSON, D. A. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, v. 9, p. 395-404, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância e Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 8ª ed. rev. – Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_bolso_4ed.pdf>. Acesso em 10 de março 2015.

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

COHEN, J. I. Infecção pelo vírus Epstein Barr, incluindo a mononucleose infecciosa. *Medicina Interna*, p.1106-9, 2008.

COSTA, I. C.; VALLADA, M. G. Mononucleose Infecciosa (Infecção pelo Vírus Epstein-Barr). *Tratado de Infectologia*, p. 577-581, 2007.
GROSS, T. G. Infectious mononucleosis and other Epstein-Barr virus related disorders. *Wintrobe's clinical hematology*, p.1589-1611, 2009.

GROTTO, I.; *et al.* Clinical and laboratory presentation of EBV positive infectious mononucleosis in young adults. *Epidemiol Infect*, v.131 n.1, p. 638-9, 2003.

LIMA, M. A. P; RABENHORST, S. H. B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.52, n.1, p. 87-96, 2006.

OLIVEIRA, J. L.; *et al.* O vírus Epstein-Barr e a mononucleose infecciosa. *Rev Bras Clin Med*. São Paulo, v.10, n.6, p. 535-43, 2012.
NAKAOKA, V. Y.; GUTIERREZ, M. M.; PEREIRA, A. M. O.; KASHIWABARA, T. G. B. Monocucleose Infecciosa - Uma Revisão de Literatura. *Revista UNINGÁ Review*, v.16, n.1, p. 44-48, 2013.

RIBEIRO-SILVA, A. R. & ZUCOLOTO, S. O Papel do Vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. The role of Epstein-Barr virus in human tumorigenesis. *Revisão Medicina*. Ribeirão Preto, v.36, p. 16-23, 2003.

SCHOOLEY, R. Infecção pelo vírus Epstein-Barr. Tratado de medicina interna. Rio de Janeiro: *Elsevier*; p. 2900-3, 2009.

SIXBEY J. M.; *et al.* Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature*, v.306, p. 480-483, 1983.

TAKACS, M.; *et al.* Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. *Biochim Biophys Acta*, p. 228-35, 2010.

YOUNG, L. S.; RICKINSON, A. B. Epstein-Barr virus: 40 Years On. *Nature Reviews Cancer*, v.4, p. 757-768, 2004.

YOUNG, L. S.; DAWSON, C. W.; ELIOPOULOS, A. G. The expression and function of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, v.53, p.238-247, 2000.

CAPÍTULO 3

Fisiopatologias associadas ao vírus Epstein-Barr

*Kellen Cristina Torres Costa
Renata Pereira Alves Balvedi
Larissa Pereira Caetano*

1. FISIOPATOLOGIAS ASSOCIADAS AO VÍRUS EPSTEIN-BARR

A importância de se estudar o vírus Epstein-Barr (EBV) vai além da obtenção de conhecimentos acerca da sua genética. O fato de este vírus estar relacionado a diversas patologias graves faz com que o estudo do EBV passe a ser uma questão de saúde pública e de importância para a humanidade.

Denis Parsons Burkitt ao descobrir o linfoma muito comum na África Subsaariana (Linfoma de Burkitt) aprofundou seus estudos e ao avaliar micrografias eletrônicas de células cultivadas a partir deste linfoma observou a presença do EBV. Assim, a ligação entre o EBV e este linfoma tornou-se a primeira de uma inesperada e grande variedade de associações descobertas entre este vírus e vários outros tumores (YOUNG & RICKINSON, 2004).

Em 1970, O DNA do EBV foi detectado em tecidos de pacientes com carcinoma nasofaríngeo (ZUR HAUSEN *et al.*, 1970). Na década de 1980, o EBV foi associado ao linfoma não Hodgkin e à leucemia de células pilosas, em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida, conhecida como AIDS , além de acarretar a mononucleose infecciosa (GREENSPAN *et al.*, 1985). Desde então, o EBV tem sido identificado em vários tumores, incluindo as síndromes linfoproliferativas de células B, o linfoma de células T e a doença de Hodgkin (WEISS *et al.*, 1989).

Em 1997, o vírus Epstein-Barr foi classificado pela *International Agency for Research on Cancer*, como um carcinógeno de grau I que, comprovadamente, causa neoplasias em humanos (NIEDOBITEK, 1999).

Também existem evidências de que o EBV possa estar associado a outros tumores malignos, como o carcinoma gástrico, o carcinoma mamário, o leiomiossarcoma, em pessoas imunodeprimidas, o carcinoma *linfoepitelioma-like* de glândulas salivares, pulmão, timo, trato hepatobiliar e esôfago (RIBEIRO-SILVA e ZUCOLOTO, 2003).

A Mononucleose Infecciosa, patologia provocada por infecção primária do vírus EBV, foi elucidada no capítulo anterior, sendo assim, trataremos a seguir das demais patologias interligadas ao mesmo agente etiológico.

1.1. Linfoma de Burkitt

O linfoma de Burkitt é um linfoma linfocítico raro com pouca diferenciação, caracterizado pela proliferação monoclonal de linfócitos-B (FREITAS *et al.*, 2008). É um tipo de linfoma não-Hodgkin altamente agressivo, que exhibe um elevado grau de proliferação celular dentre os neoplasmas humanos (BOERMA *et al.*, 2004).

Tal doença ocorre predominantemente nas primeiras décadas de vida sendo mais comum em homens e esta neoplasia possui grande afinidade pelos ossos gnáticos, especialmente maxila (Figura 1) (BREGANI *et al.*, 2004). Na cavidade oral, este tumor pode progredir muito rapidamente e se apresentar como uma tumefação facial ou uma massa exofítica envolvendo os maxilares (FREITAS *et al.*, 2008).

Diversos estudos sugerem fortemente a participação do EBV na patogênese do linfoma de Burkitt. Sequências do DNA deste vírus podem ser evidenciadas nas células-B e elevados títulos de anticorpos contra o EBV são encontrados nos pacientes portadores desta patologia (NILLER *et al.*, 2005). Estudos sugerem que o EBV inibe a morte celular programada e contribui para o desenvolvimento e manutenção do linfoma de Burkitt (HAMMERSCHMIDT & SUGDEN, 2004).

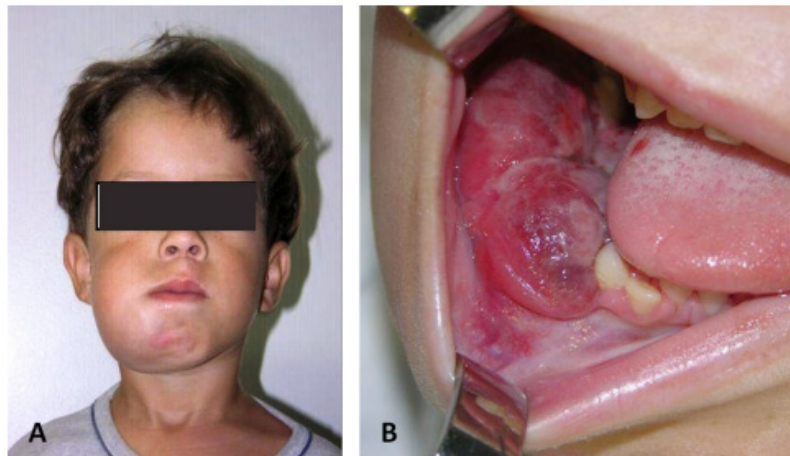


Figura 3.1. Paciente diagnosticado com Linfoma de Burkitt. (A) Assimetria facial grave no lado direito . (B) Lesão oral no maxilar direito. (PEREIRA et al., 2010).

1.2. Doença de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin é uma doença linfoproliferativa que foi descrita por Thomas Hodgkin em 1832, sendo caracterizada histopatologicamente pela presença de células neoplásicas denominadas *Reed-Sternberg* - RS (Figura 2), cuja morfologia é variada (MONTEIRO, 2010). Tal anomalia pode ocorrer em qualquer faixa etária, no entanto, é mais comum na idade dos 15 aos 40 anos, atingindo maior frequência entre 25 a 30 anos. Os órgãos e tecidos que compõem o sistema linfático incluem linfonodos, timo, baço, amígdalas, medula óssea e tecidos linfáticos no intestino (BASTIANI et al., 2014).

A doença de Hodgkin surge quando um linfócito (mais comumente um linfócito B) se transforma de uma célula normal em uma célula maligna, capaz de crescer de forma descontrolada com o intuito de disseminar-se. A célula maligna começa a produzir, nos linfonodos, cópias idênticas também chamadas de clones (BASTIANI et al., 2014).

Segundo Hjalgrim e colaboradores (2000) parece haver um risco aumentado de linfoma de Hodgkin em pacientes com uma história de mononucleose infecciosa causada pelo EBV.

A correlação do EBV com a doença de Hodgkin pode ser devido a fatores histológicos e geográficos. No Brasil, foi descrito que em 91% dos casos examinados, foi possível identificar por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) o DNA do EBV no plasma de indivíduos com doença de Hodgkin em residentes do Rio de Janeiro (MONTEIRO, 2010).

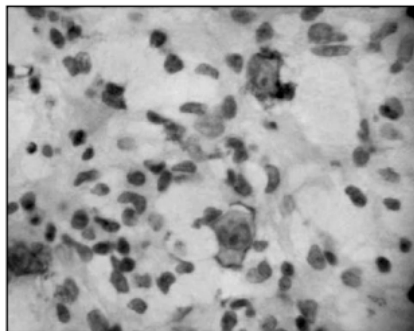


Figura 3.2. Células de Reed-Sternberg marcadas pelo CD 20 (GIESTA et al., 2009).

1.3. Carcinoma de Nasofaringe

O carcinoma da nasofaringe (NPC) constitui um tipo distinto de cancro da cabeça e pescoço. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem 3 tipos histológicos do NPC baseados no grau de diferenciação. O Tipo I diz respeito aos carcinomas epidermoides queratinizantes, o Tipo II aos não queratinizantes e o Tipo III aos carcinomas indiferenciados, também denominados de linfopiteliomas, caracterizados por um infiltrado linfocítico proeminente. Esta interação entre células tumorais e linfócitos parece ser crucial para a propagação contínua do componente maligno dos carcinomas do Tipo III (MARKS & MENCK, 1998). Destes, as variantes II e III são as mais frequentes e apresentam características etiológicas comuns sendo associadas à infecção pelo EBV (BREDA *et al.*, 2010).

Ainda segundo Breda (2010), os tumores da nasofaringe são constituídos por células neoplásicas derivadas do epitélio não queratinizante com um infiltrado linfocitário do estroma e apresentam

um prognóstico reservado entre os tumores malignos da cabeça e pescoço. Estudos publicados demonstraram que a infecção por EBV nas células epiteliais da nasofaringe ocorre antes da expansão clonal da população de células tumorais (RAAB-TRAUB, 1992).

Estudos em tecidos normais da nasofaringe e em biopsias de tecido pré-maligno demonstram a presença de alterações genéticas numa fase precoce da carcinogênese, indicando que a infecção estável das células epiteliais pelo EBV requer um ambiente celular alterado (YOUNG e RICKINSON, 2004). Diversos trabalhos e pesquisas alegam a associação da infecção pelo vírus EBV com desenvolvimento de carcinoma da nasofaringe (SPANO *et al.*, 2003).

1.4. Carcinoma gástrico

Existem diversos fatores relacionados com o desenvolvimento de câncer gástrico, dentre eles, o elevado consumo de sal, alimentos em conserva contendo compostos nitrogenados, baixo consumo de frutas e vegetais, cirurgia gástrica, lesões benignas prévias, tabagismo e infecção por *Helicobacter pylori* (LIMA *et al.*, 2011). Com relação aos adenocarcinomas, os quais respondem por 90% a 95% dos cânceres de estômago, desde o início da década de 1990 que o EBV tem sido apontado como fator de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia (SHANG & PEÑA, 2005).

A indicação de que o Epstein-Barr esteja relacionado ao processo oncogênico em carcinomas gástricos – CGs (Figura 3) é baseada no significativo percentual de associação do EBV com esses tumores, pois observa-se a presença do vírus em quase todas as células tumorais dos carcinomas gástricos EBV positivos e o caráter monoclonal dessas células (LIMA & RABENHORST, 2006).

Alguns estudos apontam para ocorrência de metilação de supressores tumorais induzida pelo EBV como um dos mecanismos virais nesse processo. Estudos de Chong e colaboradores demonstraram que apesar da elevada frequência de metilação encontrada nos genes p14, p15, p16, TIMP- 3, E-caderina, DAPK, GSTPi e MGMT em CGs EBV positivos, observaram a supressão da expressão de DNA metiltransferases, uma enzima responsável pela metilação do DNA, o que sugere uma via alternativa do vírus para metilação desses genes (CHONG *et al.*, 2003).

Apesar de haver consenso sobre alguns aspectos epidemiológicos e patológicos relacionados com a infecção pelo EBV em carcinomas gástricos, a literatura ainda apresenta alguns pontos controversos devido à complexidade desse tipo de câncer (LIMA *et al.*, 2011).

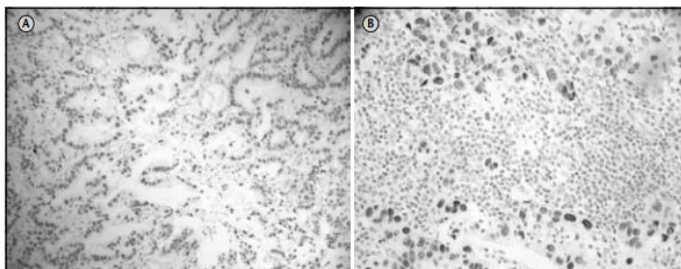


Figura 3.3. Presença de EBV em carcinoma gástrico detectada pela técnica de hibridização *in situ*. (A) Carcinoma do tipo intestinal de Lauren exibindo intensa marcação nuclear (400x); (B) Carcinoma do tipo difuso de Lauren exibindo marcação nuclear intensa e difusa (600x) (LIMA *et al.*, 2011).

1.5. Carcinoma mamário

Os três vírus mais estudados como possíveis causas de câncer de mama humano são o MMTV, o EBV e o vírus do papiloma humano (HPV), sendo que o MMTV e o EBV ocorrem em até 37% e 50% dos casos de câncer de mama, respectivamente (RODRIGUES & ROCHAEL, 2012).

Pesquisadores conseguiram demonstrar através de PCR a presença de EBV em 51 de 100 casos de carcinoma invasivo primário da mama. Tomando alguns espécimes positivos, puderam constatar através de imunohistoquímica, a expressão de EBNA-1 (antígeno nuclear do EBV) em uma fração de células tumorais e a ausência da expressão de EBER's. Recentemente, foi observado a presença de EBV do vírus em 42% dos carcinomas estudados, através de PCR e imuno-histoquímica, caracterizados também pela expressão de EBNA-1 e ausência de LMP-1 (proteína de membrana latente), e EBER-1 (pequenos RNAs codificados do Epstein-Barr). E ainda, o EBV foi detectado em lesões pré-malignas, o que aponta para a participação do vírus na carcinogênese mamária (LIMA & RABENHORST, 2006).

1. Doenças autoimunes sistêmicas

Também chamadas de doenças reumáticas do tecido conjuntivo, tais disfunções são caracterizadas pela sobreposição de sintomas clínicos e auto anticorpos - proteínas do sangue que se viram contra partes do próprio organismo - característicos (DRABORG *et al.*, 2013).

Acredita-se que a etiologia destas doenças seja multifatorial, ou seja, fatores genéticos e ambientais contribuem para seu desenvolvimento (CRUZ-TAPIAS *et al.*, 2012). Os principais fatores de risco ambiental são as infecções, incluindo o EBV que é suspeito de ter um papel central na patogênese das doenças autoimunes (DRABORG *et al.*, 2013).

O **lúpus eritematoso sistêmico** é uma doença autoimune rara, com uma prevalência de 0,09% e 9 em cada 10 pacientes são mulheres (SMITH & GORDON, 2010). Os sintomas mais comuns são o “butterfly rash” (“asas de borboleta”) na região malar, fotossensibilidade, úlceras de nasofaringe, artrite, doenças renais e hematológicas, e auto anticorpos contra componentes nucleares (PONS-ESTEL *et al.*, 2010).

O processo típico da doença é demonstrado por períodos de exacerbação da doença alternando com remissão (DRABORG *et al.*, 2013).

Muitos estudos têm relacionado O EBV para o desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico. Pacientes acometidos com tal doença mostraram ter uma carga elevada viral anormal em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), quando comparadas com pacientes controles saudáveis com um aumento de 10-40 vezes. A carga viral foi considerada associada com atividade da doença e independente de ingestão de medicação imunossupressora. Além disso, um nível elevado do DNA do EBV foi encontrado no soro de 42% de pacientes com lúpus eritematoso em comparação com apenas 3% de controles saudáveis (LU *et al.*, 2007).

As conclusões sobre o aumento da carga de EBV sugerem replicação lítica de EBV ativa em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (DRABORG *et al.*, 2013).

A **artrite reumatóide (AR)** é uma doença autoimune comum com uma prevalência de cerca de 1% e uma incidência de 5-50 por 100.000 por ano sendo três vezes mais mulheres do que pacientes do sexo masculino (SCOTT *et al.*, 2010).

Os sintomas mais comuns incluem artrite (Figura 4), complicações cardiovasculares, síndrome metabólica, cognitiva disfunção, e depressão. Além disso, são observados envolvimento de pulmões, rins, pele em pacientes com AR (MCLLNES e SCHETT, 2011). Outro fator de risco ambiental para o desenvolvimento de AR, além de infecções, é o tabagismo e outras formas de estresse pulmonar (DRABORG *et al.*, 2013).

Há tempos, o EBV tem sido suspeito em ter um papel na patogênese da artrite reumatóide. Através da utilização de vários métodos como hibridação *in situ* e PCR, foi visto o DNA/RNA do EBV em células mononucleares de sangue periférico, saliva, líquido sinovial, e membranas sinoviais de pacientes com AR (BLASCHKE *et al.*, 2000).

Uma frequência de 10 vezes mais de células B infectadas pelo vírus Epstein-Barr foi observada em pacientes com AR em relação a controles saudáveis (BALANDRAUD *et al.*, 2003). Resultados indicam uma infecção lítica generalizada do vírus em pacientes com AR, que também se localiza nas articulações, o que sugere um papel do EBV nas células infectadas por inflamação sinovial de pacientes com artrite reumatoide (CROIA *et al.*, 2012).



Figura 3.4. Deformação da mão conhecida como “pescoço de cisne” (GOELDNER *et al.*, 2011).

1.7. Mecanismos tumorigênicos

O EBV, agente etiológico da mononucleose, foi o primeiro vírus a ser descoberto como oncogênico, podendo ser associado aos linfomas, destacando-se os de Hodgkin (LH), Burkitt, ao carcinoma indiferenciado da nasofaringe, entre outros (SHIRATA *et al.*, 2008).

As células com infecção latente podem perder o controle de proliferação por mecanismos ainda pouco elucidados, mas que provavelmente estejam relacionados a disfunções do sistema imunológico e ao gene BZLF1 do EBV, que desempenha um papel chave nesse processo (RIBEIRO-SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

Há evidências que o EBNA1 possa atuar como um oncogene (RIBEIRO-SILVA e ZUCOLOTO, 2003). Virtualmente, o EBNA1 é expresso em todos tecidos neoplásicos, associados ao EBV, mas o nível de expressão pode variar entre os tipos de tumores. Já o EBNA2 induz a ativação do ciclo replicativo do EBV e sua expressão é fundamental para a transformação neoplásica de linfócitos B e o EBNA3 é essencial para a transformação neoplásica de linfócitos B, porque regula a transcrição de genes envolvidos no processo de immortalização dessas células (FUJIWARA, 2001).

Em relação aos EBER's, têm sido relatado que esses conferem resistência à apoptose em células de linfoma de Burkitt e tumorigenicidade em camundongos SCID (camundongos com imunodeficiência combinada severa), além de induzir a transcrição de IL-10 (interleucina 10) em células de Linfoma de Burkitt (LIMA & RABENHORST, 2006).

Referências

BALANDRAUD, N.; MEYNARD, J. B.; AUGER, I. “Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction,” **Arthritis and Rheumatism**, vol. 48, no. 5, pp. 1223–1228, 2003.

BASCHKE, S.; SCHWARZ, G.; MONEKE, D.; BINDER, L.; MULLER, G.; REUSS-BORST, M. “Epstein-Barr virus infection in peripheral blood mononuclear cells, synovial fluid cells, and synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis,” **Journal of Rheumatology**, vol. 27, no. 4, pp. 866–873, 2000.

BASTIANI, M. F.; CORRÊA, L. F.; FABRES, R. B.; VALENTINI, V. Prevalência do vírus Epstein- Barr como agente etiológico da Doença de Hodgkin. **NewsLab**, 124, pp. 106-108, 2014.

BOERMA, E. G.; VAN IMHOFF, G. W.; APPEL, I. M. et al. Gender and age-related differences in Burkitt lymphoma - epidemiological and clinical data from The Netherlands. **European Journal of Cancer**, 40:2781-7, 2004.

BREDA, E., et al. Detecção de Epstein-Barr virus no carcinoma da nasofaringe: implicações numa área de baixo risco. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, [online], vol.76, n.3, pp.310-315. ISSN 1808-8694, 2010.

BREGANI, E. R.; BALZARINI, L.; CABIBBE, M. African Burkitt Lymphoma successfully treated with CEOP polychemotherapy. **Acta Tropica**, 92:91-4, 2004.

CHONG, J. M.; SAKUMA, K.; SUDO, M.; USHIKU, T.; UOZAKI, H.; SHIBAHARA, J. Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein- Barr virus. **Cancer Science**, 94(1):76-80, 2003.

CROIA, C.; SERAFINI, B.; BOMBARDIERI, M. “Epstein-Barr virus persistence and infection of autoreactive plasma cells in synovial lymphoid structures in rheumatoid arthritis,” **Annals of the Rheumatic Diseases**, 2012.

CRUZ-TAPIAS, P.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; MAIER-MOORE, S.; ANAYA, J. M. “HLA and Sjogren’s syndrome susceptibility. A meta- analysis of worldwide studies,” **Autoimmunity Reviews**, vol. 11, no. 4, pp. 281–287, 2012.

DRABORG, A. H.; DUUS, K.; HOUEN, G. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases. Clinical and Developmental Immunology, 2013.

FREITAS, R. A.; BARROS, S. S. L. V.; QUINDERE, L. B. Linfoma de Burkitt oral: relato de caso. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia** [online]. Vol.74, n.3, pp. 458-461. ISSN 00347299, 2008.

FUJIWARA S. Epstein-Barr virus nuclear protein 2-induced activation of the EBV-replicative cycle in Akata cells: analysis by tetracycline-regulated expression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, 258: 35-50, 2001.

GIESTA, R. P. et al. Influência do CD 20 na refratariedade do linfoma de Hodgkin clássico ao tratamento inicial com o esquema ABVD, no Ceará, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** [online]. Vol.45, n.3, pp. 247-252. ISSN 1676-2444, 2009.

GOELDNER, I.; SKARE, T. L.; REASON, I. T. M.; UTIYAMA, S. R. R. Artrite reumatoide: uma visão atual, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, vol. 47, n.5, pp. 495-503. ISSN 1676-2444, 2011.

GREENSPAN JS; GREENSPAN D; LENNETTE ET; ABRAMS DI; CONANT MA; PETERSEN V & FREESE UK. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral “hairy leukoplakia, an AIDS-associated lesion. **New England Journal of Medicine**, 313: 1564-1571, 1985.

HAMMERSCHMIDT, W.; SUGDEN, B. Epstein-Barr virus sustains Burkitt's lymphomas and Hodgkin's disease. **Trends in Molecular Medicine**, 10:331-6, 2004.

HJALGRIM, H.; ASKLING, J.; SORENSEN, P. Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. **Journal of the National Cancer Institute**, 92:1522, 2000.

LIMA, M. A. P.; FERREIRA, M. V. P.; BARROS, M. A. P.; PARDINI, M. I. M. C.; FERRASI, A. C.; RABENHORST, S. H. B. Detecção do vírus Epstein-Barr (EBV) em adenocarcinomas gástricos procedentes dos estados do Ceará e de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 2, p. 171-179, 2011.

LIMA, M. A. P.; RABENHORST, S. H. B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 52(1): 87-96, 2006.

LU, J. J. Y.; CHEN, D. Y.; HSIEH, C. W.; LAN, J. L.; LIN, F. J.; LIN, S. H. “Association of Epstein-Barr virus infection with systemic lupus erythematosus in Taiwan,” **Lupus**, vol. 16, no. 3, pp. 168–175, 2007.

MARKS, J. E.; MENCK, H. R. The National Cancer Data Base report on the relationship of race and national origin to the histology of nasopharyngeal carcinoma. **Cancer**, 83:582-8, 1998.

MARRÃO, G. M. F. **Vírus Epstein-Barr e Carcinoma mamário**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra. 2008.

MCLNNES, I. B.; SCHETT, G. “The pathogenesis of rheumatoid arthritis,” **The New England Journal of Medicine**, vol. 365, no. 23, pp. 2205–2219, 2011.

MONTEIRO, T. A. F. **Detecção do genoma do vírus de Epstein Barr (EBV) em tecidos de pacientes com Doença de Hodgkin da região norte do Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários). Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Pará, Belém, Pará. 2010.

NIEDOBITEK G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? **Virch Arch** **435**: 79-86, 1999.

NILLER, H. H.; SALAMON, D.; BANATI, F.; SCHWARZMANN, F.; WOLF, H.; MINAROVITS, J. The LCR of EBV makes Burkitt's lymphoma endemic. *Trends in Microbiology*. 12:495-9, 2005.

PEREIRA, C. M. et al. Burkitt's lymphoma: clinic progression and prognosis: two diferente cases reports in Young patientes. **Revista Odonto Ciência**, [online]. Vol.25, n.4, pp. 417-421. ISSN 1980-6523, 2010.

PONS-ESTEL, G. J.; ALARC'ON, G. S.; SCOFIELD, L. REINLIB, L.; COOPER, G. S. "Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus," **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, vol. 39, no. 4, pp. 257–268, 2010.

RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. **Seminars in Cancer Biology**; 3(5):297-307, 1992.

RIBEIRO-SILVA, A. R. & ZUCOLOTO, S. O Papel do Vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. The role of Epstein-Barr virus in human tumorigenesis. **Revisão Medicina**, Ribeirão Preto, 36: 16-23, 2003.

RODRIGUES, F.; ROCHAEL, M. C. O Possível Envolvimento do HPV no Câncer de Mama. DST - **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, 23(4):178-181 - ISSN: 0103-4065, 2011.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, W. J. "Rheumatoid arthritis," **The Lancet**, vol. 376, no. 9746, pp. 1094–1108, 2010.

SHANG, J.; PEÑA, A. S. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 27, p. 4131-9, 2005.

SHIRATA, N. K. et al. A pesquisa do vírus do Epstein-Barr (EBV) pela reação de hibridização *in situ* realizada no Núcleo de Patologia Quantitativa – Centro de Patologia – IAL. **Boletim Epidemiológico Paulista** [online], vol.9, n.107, pp. 18-22. ISSN 1806-4272, 2012.

SMITH, P. P.; GORDON, C. “Systemic lupus erythematosus: clinical presentations,” **Autoimmunity Reviews**, vol. 10, no. 1, pp. 43–45, 2010.

SPANO, J. P. B. P.; ATLAN, D.; BOURHIS, J.; PIGNON, J. P.; ESTEBAN, C.; ARMAND, J. P. Nasopharyngeal carcinomas: an update. **European Journal of Cancer** **39**: 2121-35, 2003.

WEISS LM; MOVAHED LA; WARNKE RA & SKLAR J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin’s disease. **New England Journal of Medicine** **320**: 502-506, 1989.
YOUNG, L.S.; RICKINSON, A.B. Epstein-Barr virus: 40 Years On. **Nature Reviews Cancer**, *4*, 757–768, 2004.

ZUR HAUSEN H; SCHULTE-HOLTHAUSEN H; KLEIN G; HENLE W; HENLE G; CLIFFORD P & SANTESSON L. EBV DNA in biopsies of Burkitt’s tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. **Nature**, 228: 1056-1058, 1970.

CAPÍTULO 4

Diagnósticos do vírus Epstein-Barr

*Ana Beatriz Almeida de Moraes
Kellen Cristina Torres Costa*

1. IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO

Devido à presença do vírus Epstein-Barr se apresentar na maioria da população de forma assintomática, a investigação da compleição do vírus geralmente só ocorre quando o indivíduo procura atendimento médico, normalmente apresentando alguns sintomas das doenças associadas ao EBV, na maioria das vezes, mononucleose infecciosa e alguns tipos de linfomas. O diagnóstico clínico não pode confirmar a presença do vírus, porém a presença de sintomas típicos das doenças associadas é o primeiro passo para a investigação necessária (AMON; FARRELL, 2005).

O diagnóstico correto deve confirmar a carga viral do EBV presente no organismo por meio de exames laboratoriais específicos e assim, tentar prevenir outras complicações que poderiam estar relacionadas à presença do vírus, principalmente em indivíduos que apresentam algum tipo de imunocompetência, onde as complicações são recorrentes e surgem de forma agressiva, podendo ser letal, apesar de raro, em alguns casos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A detecção do vírus pode ocorrer por contribuição de diversas técnicas como, PCR (Reação em cadeia de polimerase), hidratação *in situ*, técnicas imunohistoquímicas, imunocitoquímicas e uso de microscopia óptica ou eletrônica (FIGUEIREDO, 2009). Ainda, outras tecnologias recentes, como o desenvolvimento de biossensores, estão sendo avaliadas e aperfeiçoadas no intuito de revolucionar o diagnóstico de doenças (ALVES-BALVEDVI *et al.*, 2014).

1.1. Testes imunohistoquímicos (IHQ)

A presença do vírus EBV pode ser confirmada de forma eficaz através de exames imunohistoquímicos (IHQ), ou seja, testes que envolvem a detecção da expressão de proteínas localizadas nas células dos tecidos utilizando o princípio antígeno/anticorpo. Estes testes podem ser realizados usando amostras de fase aguda da manifestação de sintomas, onde o tecido (biópsia) é testado com anticorpos para EBV com diversos antígenos associados que são revelados por um marcador visual e posteriormente examinados por meio da microscopia óptica ou eletrônica (HENLE *et al.*, 1974).

A interpretação da relação dos anticorpos heterófilos e dos anticorpos contra antígenos específicos é de suma importância na investigação das infecções causadas pelo vírus EBV, os anticorpos heterófilos são anticorpos IgM que reagem contra antígenos da superfície de hemácias de outras espécies mas não reagem com antígenos de células renais de uma cobaia, estão presentes em cerca de 90% dos pacientes com mononucleose infecciosa (MI), durante algum momento da evolução da doença, a avaliação destes anticorpos normalmente ocorre por dois métodos similares: Monoteste e Reação de Paul Bunnell Davidsohn (HENLE *et al.*, 1974).

1.2. Monoteste e Reação de Paul Bunnell Davidsohn

O monoteste é normalmente o primeiro teste solicitado quando há suspeita de infecção pelo vírus epstein-barr. Trata-se de um teste de aglutinação rápido e simples denominado hemaglutinação direta, o qual se assemelha, quanto à sensibilidade, ao teste de Paul Bunnell Davidsohn (LLOR *et al.*, 2012).

O teste de Reação de Paul Bunnell Davidsohn é utilizado quando ocorre aglutinação de hemácias de carneiro em título igual ou superior a 1/56, assim, é avaliada a absorção do soro com hemácias de boi e rim de cobaia. Quando o diagnóstico de Mononucleose infecciosa é confirmando há redução de cerca de 90% do título do soro após absorção por hemácias do boi, a avaliação da absorção permite diferenciar os anticorpos presentes antes e depois da infecção. Normalmente estes se tornam positivos na presença da mononucleose

infecciosa em torno de quatro semanas após a infecção, retardam sua concentração, mas ainda podem ser detectados por alguns meses após a fase aguda (LLOR *et al.*, 2012) . Porém, podem ocorrer resultados do tipo falso – positivo, quando o indivíduo é portador de outras doenças, como a doença de chagas e hepatite, ou ainda, não ser detectáveis (crianças menores de quatro anos). Neste caso, existe a necessidade da determinação de anticorpos para antígenos específicos (RICHARD *et al.*, 1999).

Porém, podem ocorrer resultados do tipo falso-positivo, especialmente quando o indivíduo é portador de outras doenças, como a doença de chagas ou hepatite, ou ainda não ser detectáveis, (crianças menores de quatro anos). Nestes casos, a necessidade da determinação de anticorpos para antígenos específicos torna-se essencial (RICHARD *et al.*, 1999).

1.3. Anticorpos contra antígenos específicos

Dentre as diversas técnicas que remetem ao uso de anticorpos para antígenos específicos, àquelas que ganham mais destaque, especialmente tratando-se de diagnóstico para o vírus Epstein-barr são a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e também o método ELISA, ambos com alta sensibilidade e especificidade (AOKI *et al.*,2010).

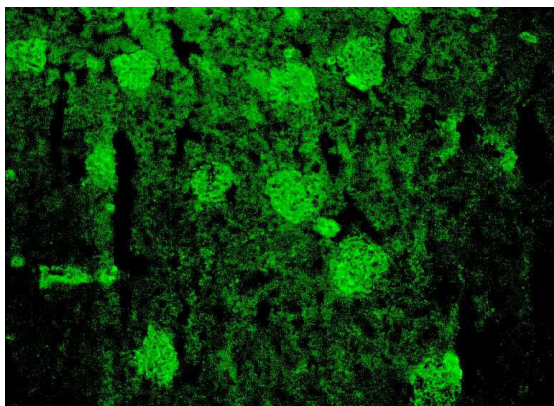
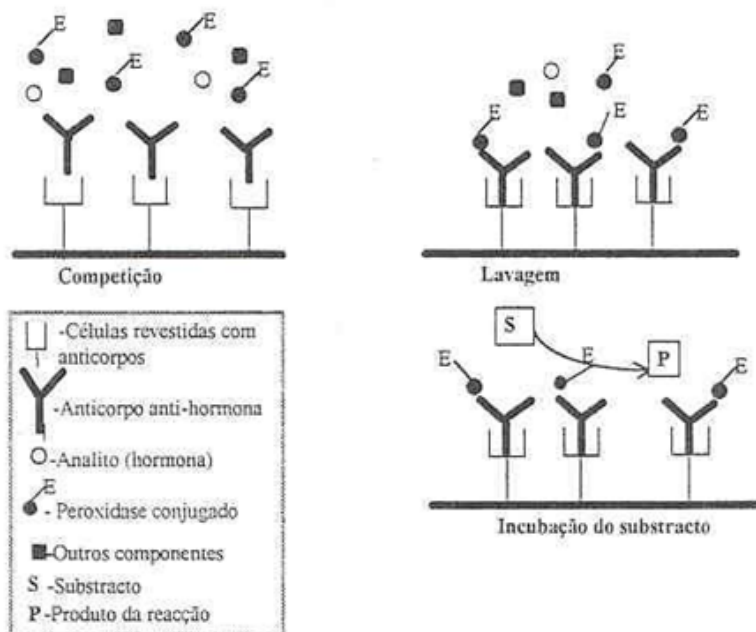


Figura 4.1. Visualização de anticorpos pelo método de imunofluorescência indireta.
Fonte: www.hepcentro.com.br

Na imunofluorescência indireta (IFI), os anticorpos no soro do paciente são detectados por meio de antígenos fixados em uma lâmina, na qual se aplica um anticorpo específico não fluorescente. Posteriormente, deposita-se um anticorpo fluorescente com especificidade marcada contra determinados antígenos do primeiro anticorpo usado para reação específica, esta técnica possibilita o uso de diversos anticorpos primários específicos para distintos tipos de antígenos e ainda permite identificar a classe pertencente ao anticorpo. A visualização é melhor em termos de qualidade quando se compara a técnica de imunofluorescência direta (AOKI *et al.*, 2010).

A técnica do teste ELISA é baseada no princípio da imobilização de um antígeno ou anticorpo, em fase sólida (fixado), e no uso de um conjugado, que pode ser um antígeno ou uma imunoglobulina, ligado a uma enzima. A adição de um substrato leva a formação de um produto colorido que é analisado por um espectrofotômetro adaptado a leitura das placas. É uma técnica bastante sensível e eficaz, entretanto ~~o método~~ pode apresentar algumas variações na metodologia como ELISA direto, indireto e competitivo (MATHESON *et al.*; 1990).

Para o diagnóstico procuram-se os antígenos contra o capsídeo viral (VCA). Os anticorpos anti-VCA IgM e IgG tornam-se rapidamente positivos nas primeiras duas semanas de infecção. A presença de IgM anti-VCA normalmente indica infecção aguda pelo vírus EBV, entretanto, outros herpes virus, podem causar produção de IgM anti-VCA por células que apresentam infecção latente pelo EBV podendo levar a resultados falso-positivos de IgM anti-VCA que também são descritos em infecções recentes como toxoplasmose. Nos quadros de reativação do vírus a IgM anti-VCA pode ser negativa. Resultado do tipo falso- negativos podem ocorrer devido a natureza transitória do IgM. O IgM anti-VCA permanece até oito semanas, os anticorpos IgG anti-VCA surgem na fase aguda, tem pico em até quatro semanas e persistem por toda a vida (SCHAADE *et al.*, 2001).



Representação esquemática do método ELISA

Fonte: http://www.ipv.pt/millennium/millennium26/26_21.htm

Figura 4.2. Representação esquemática do método ELISA. Fonte: www.evidenciasaude.com.br

1.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização in situ (IHS).

Nos últimos anos, as técnicas mais utilizadas para detecção do vírus no corpo humano têm sido a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização in situ (IHS) (ROWE *et al.*, 1997).

A técnica de PCR permite a detecção de quantidades mínimas de DNA viral em esfregaços e tecidos, é um método rápido, sensível e apresenta boa especificidade. Além disso, permite a utilização de biópsias que foram parafinadas e mantidas em arquivos possibilitando estudos posteriores à coleta (ROWE *et al.*, 1997; DIAS *et al.*; 2009)

A PCR, *in vitro*, permite a duplicação de cadeias de DNA, envolvendo nucleotídeos, sequências iniciadoras (primers) e a enzima

polimerase. Após alguns ciclos de duplicação é possível a obter muitas cópias de uma sequência específica de DNA, a partir de uma fita molde. O resultado é visualizado através de uma [eletroforese](#) em gel de [agarose](#) ou gel de [poliacrilamida](#) e deve ser interpretado por um profissional competente (SAIKI *et al.*, 1998).

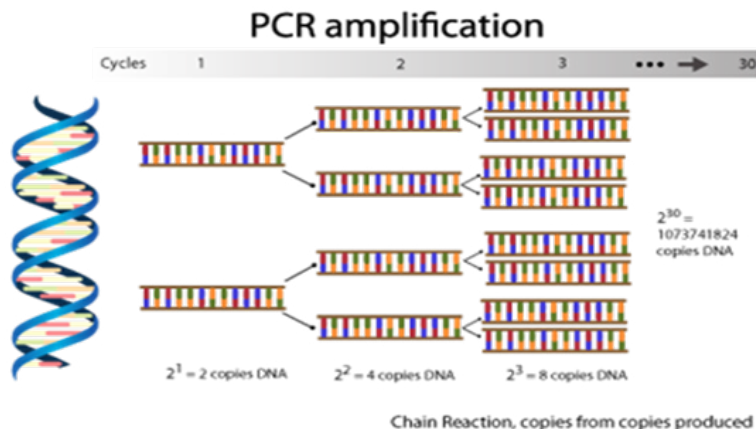


Figura 4.3. Representação da amplificação do DNA por método de PCR. Fonte: <http://www.gmoteſting.com/Testing-Options/Genetic-analysis>

O processo de hibridação *in situ* (HIS) consiste em detectar sequências específicas de DNA ou RNA utilizando-se sequência complementar de ácidos nucleicos (sonda) marcados radioativa ou quimicamente. A HIS pode ser aplicada em material rotineiramente fixado em formol e incluído em parafina, em alguns casos pode-se até utilizar material obtido de necropsias (GULLEY, 2001).

A hibridização *in situ* é uma técnica mais sensível que a imunohistoquímica, porém inferior à PCR, onde, além da identificação do DNA desejado, há sua amplificação, gerando um sinal mais intenso, o que permite uma melhor identificação de um número menor de cópias (GULLEY, 2001).

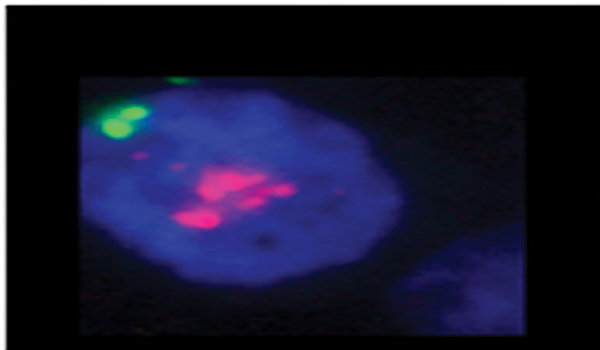


Figura 4.4. Representação da hibridação *in situ* utilizada para diagnóstico. Fonte: www.conspat.com.br/conspat/examesof

2. Tratamento, profilaxia e cura

As doenças causadas por herpesvírus são muito diversas e, como tal, a terapêutica específica para cada uma dessas doenças é muito variável. Não existe até o presente momento terapêutica antiviral com eficácia comprovada contra o EBV, sendo assim, o tratamento visa amenizar os sintomas na fase aguda da infecção provocada pelo vírus (COHEN,2008).

O tratamento médico na fase aguda da manifestação do vírus pode incluir ao paciente recomendação de repouso e evitar esforços físicos durante as primeiras semanas de doença. Pode-se ainda aliviar sintomas como febre e dor, usando medicamentos como paracetamol ou aspirina. Faringites (devido constituição de tecido linfóide) e eritemas difusos podem ser amenizados com o uso de antibióticos como Penicilina, Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina ou Cefalosporina (COHEN, 2008).

Existem diferentes terapias antivirais que atuam especificamente na replicação do vírus, sendo os mais comuns, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir e foscarnet. Podem ser prescritos como prevenção ou aplicados em lesões cutâneas de forma a diminuir a intensidade e a duração destas, porém algumas pesquisas indicaram que apesar deste serem capazes de inibir a replicação do EBV *in vitro*, não altera a evolução clínica da doença e não apresenta eficácia comprovada (PACHECO *et al.*, 2001). Estes antivirais não parecem surtir efeito na fase aguda da infecção (OERTEL; RIESS, 2002)

A terapia com corticosteróides não está indicada em todos os casos podendo predispor o indivíduo imunossuprimido à infecção secundária. (COHEN, 2008).

Deve-se ressaltar que nenhuma destas terapias representa cura para a infecção do vírus uma vez que apenas atuam na fase ativa do vírus, não tendo qualquer ação na fase latente impedindo sua replicação e permanência do vírus no organismo, sendo assim o indivíduo portador do vírus EBV não se livra do vírus, mas o estado de latência e evolução do mesmo dependerá do próprio indivíduo, sua genética, seu estado de imunocompetência ou de imunodeficiência (PACHECO *et al.*, 2001).

Não existem vacinas que possam prevenir a infecção por EBV (PACHECO *et al.*, 2001), sendo assim, alguns pesquisadores estão trabalhando no desenvolvimento de vacinas contra o vírus EBV, pesquisas usando vacinas dirigidas à principal glicoproteína do EBV têm apresentado alguns resultados importantes em estudos utilizando animais, porém ainda há diversas dificuldades para a produção de uma vacina efetiva (COHEN, 2008).

O diagnóstico rápido e preciso de vírus Epstein-Barr é um diferencial na tentativa de diminuir a rejeição e as complicações principalmente em pacientes transplantados, assim como pode ajudar na questão dos fatores de risco para o desenvolvimento de tumores associados ao vírus.

Dessa forma, o diagnóstico diferencial do EBV pode ser a chave para, além do tratamento adequado, a prevenção de outras doenças ou evitar o risco de complicações como a rejeição de órgãos em pacientes transplantados e imunodeprimidos (Modificado de ANTENOR, 2004).

Referências

ALVES-BALVEDI, R. P.; CASTRO, A. C. H.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Detection of a Specific Biomarker for Epstein-Barr Virus Using a Polymer-Based Genosensor. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 9051-9066.

AMON, W.; FARRELL J. P. [Reactivation of Epstein-Barr virus from latency](#). *Reviews in Medical Virology*, V.15, n. 3, p. 149-156, 2005.

ANTENOR, S. Diagnóstico antecipado. *Análises Clínicas. Pesquisa FAPESP* 101, Julho 2004, p. 74-77

ANDERSSON, A; VETTER, V; KREUTZER, L; BAUER, G. Avidities of IgG directed against viral capsid antigen or early antigen: useful markers for significant Epstein-Barr virus serology. **Journal of Medical Virology**, v.43, n.3, p. 238-44, 1994

AOKI, V.; SOUSA, J.X. JR.; FUKUMORI, L.M.I.; PERIGO, A.M.; FREITAS, E.L.; OLIVEIRA, Z.N.P.; Imunofluorescência direta e indireta. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.

COHEN, J.I. Infecção pelo vírus Epstein Barr, incluindo a mononucleose infecciosa, **Medicina Interna**, 17ª Ed, New York, p.1106-9, 2008.

COHEN, J.I.; FAUCI, A.S.; VARMUS, H. *et al.* Epstein-Barr virus: an important vaccine target for cancer prevention. **Science Translational Medicine**, v.3, n.107, p.7, 2011.

DIAS, P.E; ROCHA, L. M.; CARVALHO, O.M ; AMORIM, F.M.L. Detecção do vírus Epstein-Barr em tonsilites recorrentes. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, vol.75, n.1, São Paulo, 2009.

FIGUEIREDO, L.T.M. Mononucleose infecciosa. **Tratado de clínica médica**, São Paulo, Editora Roca, p.3862-4, 2009.

GULLEY, M. L. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v.3, n.1, p.1-10, 2001.

HENLE, W.; HENLE, G.E.; HORWITZ, C.A. Epsteinbarr virus specific diagnostic test in infectious mononucleosis. **Human Pathology**, v.5, p.551-65, 1974.

[LLOR, C.](#); [HERNÁNDEZ, M.](#); [HERNÁNDEZ, S.](#); [MARTÍNEZ, T.](#); GÓMEZ F.F. Validity of a point-of-care based on heterophile antibody detection for the diagnosis of infectious mononucleosis in primary care. **The European journal of general Practice**, v.18, n.1, p.15-21, 2012.

MATHESON, B. A., CHISHOLM, S. M., & HO-YEN, D. O. Assessment of rapid ELISA test for detection of Epstein-Barr virus infection. **Journal of Clinical Pathology**, v.43, n.8, p. 691–693, 1990.

OERTEL, S. H.; RIESS, H. Antiviral treatment of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferations. **In: Immunosurveillance, Immunodeficiencies and Lymphoproliferations**, Springer Berlin Heidelberg, p. 89-95, 2002.

OLIVEIRA, J. L.; et al. O vírus Epstein-Barr e a mononucleose infecciosa. **Rev Bras Clin Med**. São Paulo, v.10, n.6, p.535-43, 2012.

PACHECO, S.J.B.; LEITE, J.P.G.; TRÓCOLI, M.G.C. Infecções virais agudas do sistema nervoso central. **Abordagem Atual das Doenças Infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro, Editora Cultura Médica, p. 663-91, 2001.

RICHARD, R.; ALISON, W.; JOSIE G. Evaluation of a Novel Dry Latex Preparation for Demonstration of Infectious Mononucleosis Heterophile Antibody in Comparison with Three Established Tests. **Jornal of clinical Microbiology**, v.37, n.1, p. 95-98, 1999.

RICHARD, R.; ALISON, W.; JOSIE G. Evaluation of a Novel Dry Latex Preparation for Demonstration of Infectious Mononucleosis Heterophile Antibody in Comparison with Three Established Tests. **Jornal of clinical Microbiology**, v.37, n.1, p. 95-98, 1999.

ROWE, D. T., *et al.* Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein-Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant patients with lymphoproliferative disorders. **Journal of clinical microbiology**, v.35, n.6, p.1612-1615, 1997.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v.239, n. 4839, p. 487-91, 1988.

SCHAADE, L., KLEINES, M., & HÄUSLER, M. (2001). Application of Virus-Specific Immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA Antibody Detection with a Polyantigenic Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Epstein-Barr Virus Infections in Childhood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.11, p. 3902- 3905, 2001.

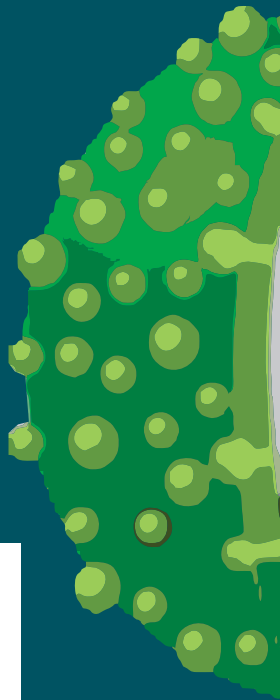


Gráfica e Editora

Fone: (34) 3236-1761
contato@graficaedibras.com.br

Esta obra está organizada em quatro partes: histórico, classificação e informações acerca do vírus Epstein-Barr; as formas de transmissão juntamente à doença causada pelo agente etiológico; as desordens que podem estar relacionadas com a infecção do vírus e, por fim, os diagnósticos atuais para a detecção viral e perspectivas de tratamentos.

Em uma linguagem objetiva e ao mesmo tempo enriquecedora, o livro traz uma breve revisão científica que possibilita ao leitor um conhecimento amplo e didático do vírus Epstein-Barr.



ISBN: 978-85-67803-75-3



9 788567 803753

Edibrás
Gráfica e Editora