



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



**Monografia**

**FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS  
INFECTADAS PELO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR EM  
TONSILAS PEDIÁTRICAS**

**Amanda Acioli de Almeida**

Salvador (Bahia)  
Fevereiro, 2014

**UFBA/SIBI/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira**

A447 Almeida, Amanda Acioli de  
Frequência e distribuição de células infectadas pelo vírus de Epstein-Barr em tonsilas pediátricas / Amanda Acioli de Almeida. Salvador: AA, Almeida, 2014.

VIII; 68 fls.

Inclui anexos.

Orientadora: Profª. Drª. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo.

Monografia (Conclusão de Curso) Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Salvador, 2013.

1. EBV. 2. Tonsilas. 3. Hibridização *in situ*. I. Araújo, Iguaracyra Barreto de Oliveira. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU: 616.4



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **FREQUÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS INFECTADAS PELO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR EM TONSILAS PEDIÁTRICAS**

**Amanda Acioli de Almeida**

Professor orientador: **Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2013.2, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Fevereiro, 2014

**Monografia:** *Frequência e distribuição de células infectadas pelo vírus de Epstein-Barr em tonsilas pediátricas*, de **Amanda Acioli de Almeida**.

Professor orientador: **Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo**

**COMISSÃO REVISORA:**

- **Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo** (Presidente), Professora Associada I do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Marcus Antônio de Mello Borba**, Professor Adjunto I do Departamento de Cirurgia Experimental e Especialidades Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Regina Terse Trindade Ramos**, Professora Adjunta II do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Bahia Universidade Federal da Bahia.
- **André Mauricio Souza Fernandes**, Doutorando do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde (PPgCS) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VI Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

*Há mais pessoas que desistem, do que pessoas que fracassam!*  
**(Henry Ford)**

**Aos meus pais, Josenilda Maria B. A. de Almeida e Renato S. de Almeida pelo apoio incondicional. À minha irmã Renata A. de Almeida e a Lucas B. Robatto pelas sugestões e amizade.**

## **EQUIPE**

- Amanda Acioli de Almeida, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Endereço para contato: Rua Alberto Valença, 80 Apto. 603, bairro Pituba – 41810-825 Salvador, Bahia, Brasil. Correio-e: [amanda.acioli@gmail.com](mailto:amanda.acioli@gmail.com).
- Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: [iguaracyraaraujo@gmail.com](mailto:iguaracyraaraujo@gmail.com); [iaraujo@ufba.br](mailto:iaraujo@ufba.br).

## **INSTITUIÇÃO PARTICIPANTE**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

1. Recursos próprios.

## AGRADECIMENTOS

- ◆ À professora **Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo**, por me introduzir ao mundo científico, instigando sempre a curiosidade e a sede pelo conhecimento.
- ◆ Aos membros do Grupo de Estudos em Linfoma da Bahia (GELB), pelas sugestões e críticas fundamentais à construção deste trabalho.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E QUADROS</b>	<b>4</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>5</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>7</b>
III.1. Histórico, epidemiologia e transmissão	7
III.2. Estrutura Viral	10
III.2.1 Genoma Viral	10
III.2.2 Capsídio Viral	12
III.2.3 Tegumento	13
III.2.4 Envelope	14
III.3. Mecanismos de infecção pelo vírus de Epstein-Barr vírus	16
III.4. Proteínas virais, RNA viral e papel patogênico	18
III.4.1 LMP1	19
III.4.2 LMP2	19
III.4.3 EBNA1	20
III.4.4 EBNA2	20
III.4.5 EBNA3	20
III.4.6 microRNAs (miRNAs)	21
III.4.7 EBERs	21
III.4.8 Padrões de Latência	21
IV.5. Oncogênese	22
<b>V. METODOLOGIA</b>	<b>23</b>
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>28</b>
VI.1. Análise Qualitativa das Lâminas	28
VI.2. Frequência da Infecção pelo EBV em Tonsilas Palatinas	28
VI.3. Distribuição das Células Infectadas nas Tonsilas	28
VI.4. Morfologia das Células Infectadas nas Tonsilas	29
VI.5. Quantificação das Células Infectadas em Tonsilas	29
<b>VIII. DISCUSSÃO</b>	<b>37</b>
<b>IX. CONCLUSÕES</b>	<b>43</b>
<b>X. SUMMARY</b>	<b>44</b>

<b>XI.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>50</b>
•ANEXO I-TDCLE	50
•ANEXO II- Fotos	52
•ANEXO III- Pareceres CEP	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

CG: Centrogerminativo  
CNF: Carcinoma de Nasofaringe  
EBV: *Epstein-Barr virus*  
EBER: *EBV-encoded RNAs*  
EBNA: *EBV nuclear antigen*  
HHV-4: Herpesvírushumano 4  
HSV1: Herpesvírus simples 1  
IF: Interfolicular  
LB: Linfoma de Burkitt  
LGCB: Linfomas de Grandes Células B  
LH: Linfoma de Hodgkin  
LMP: *Latentmembraneproteins*  
LNK: Linfomas de Células NK  
LT: Linfomas T  
MI: MononucleoseInfecciosa  
mi-RNAs: micro-RNAs  
OMS: OrganizaçãoMundial de Saúde  
ORF: *Open-readingframes*  
RSC: *Reed-Sternberg Cells*  
ROS: *Reactive Oxygen Species*  
TR: *Terminal regions*  
VCA: *Viral capsidantigen*

## ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS E QUADROS

### FIGURAS

- FIGURA I.** Modelo da estrutura do EBV 15  
**FIGURA II.** Infecção pelo EBV em humanos 16

### GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.** Colunas apresentando quantidade de lâminas negativas, positivas e 32  
excluídas  
**GRÁFICO 2.** Colunas apresentando quantidade de lâminas com expressão de EBER 32  
em zona extrafolicular, centro germinativo ou ambos

### QUADROS

- QUADRO 1.** Moléculas virais envolvidas com a patogênese de neoplasias malignas e 21  
participação nos perfis de latência  
**QUADRO 2.** Unitermos utilizados nos diferentes bancos de dados 24  
**QUADRO 3.** Discriminação dos casos por número máximo de células EBER positivas 30  
por campo de menor aumento e dez campos de maior aumento, e local da expressão de  
EBER  
**QUADRO 4.** Lâminas excluídas 33  
**QUADRO 5.** Dados encontrados em lâminas positivas 33

## I. RESUMO

**Introdução:** O Vírus de Epstein-Barr (EBV) infecta cerca de 90% da população mundial, causando infecção benigna e autolimitada, e tem sido associado a alguns subtipos de linfomas. Em nosso meio, linfomas de Burkitt pediátricos e linfomas de Hodgkin estão associados ao EBV, em cerca de 87% dos casos. **Objetivo:** Identificar padrão morfológico da infecção pelo EBV em tonsilas palatinas pediátricas, consideradas porta de entrada da infecção. **Métodos:** Cento e vinte tonsilas com hiperplasia linfoide, submetidas a hibridização *in situ* para EBER1 e 2 foram reavaliadas quanto a localização e quantificação das células infectadas. Após a microscopia, 6 foram excluídas. Como controle positivo foram usadas 3 tonsilas mononucleose-símile. **Resultados:** Quarenta e uma (36,9%) das 111 tonsilas foram positivas (36,9%) para EBER. As células estavam localizadas em região interfolicular (95,1%), região intra-epitelial (39%) e centro germinativo (19,5%). A densidade da infecção foi considerada baixa (até 10 células/campo), moderada (11 até 20 células/10 campos); alta densidade (acima de 20 células/10 campos) e *hot spots* (acima de 50 células/campo). A maioria dos casos exibiu baixa e moderada quantidade de células infectadas (75% dos casos). Os três mononucleose-símile apresentavam alta densidade de células infectadas e células transformadas. **Conclusões:** A frequência da infecção pelo EBV no nosso trabalho foi semelhante ao publicado na literatura. Porém, o padrão da infecção em centro germinativo foi distinto com muitas células infectadas. Este achado pode estar relacionado a alta frequência da infecção pelo EBV em linfomas pediátricos, cujas células precursoras reconhecidamente participaram da reação do centro germinativo. Entretanto, para avaliar o impacto desta infecção na gênese de infomas no nosso meio são necessários estudos epidemiológicos, a exemplo do que foi demonstrado na África.

**Palavras-chave:** EBV;Tonsilas;Hibridização *in situ*

## **II. OBJETIVOS**

### PRINCIPAL

Determinar a frequência e distribuição da infecção pelo EBV em tonsilas pediátricas enviadas ao serviço de patologia do HUPES para estudo histopatológico entre 1996 e 1999.

### SECUNDÁRIOS

1. Determinar a porcentagem das tonsilas infectadas pelo EBV através de hibridização molecular para EBER1 e EBER2.
2. Determinar a localização das células infectadas nos diferentes compartimentos da tonsila palatina (epitélio, centro germinativo e zonainterfolicular).
3. Determinar a morfologia das células (pequenas ou grandes transformadas).
4. Quantificar as células nas tonsilas palatinas, correlacionando com o compartimento infectado.

### **III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### 1. Histórico, epidemiologia e transmissão

Em 1964, Epstein e seus colaboradores, Bert Achong e Yvonne Barr, identificaram partículas virais em cultura de células de linfomas africanos enviados por Denis Burkitt ao seu laboratório. Este vírus, até então desconhecido, foi denominado de vírus de Epstein-Barr (EBV), classificado como Herpesvírus Humano 4 (HHV-4), sendo este um marco dos estudos sobre a oncogênese viral.

Apesar de descoberto em associação com neoplasia, o EBV é cosmopolita e cerca de 90% da população humana mundial está infectada por este vírus (Cohen, 2000). Em geral, a infecção é benigna e autolimitada, não tem variação sazonal nem predisposição por sexo (Luzuriaga & Sullivan, 2010). É incomum a ocorrência da infecção no primeiro ano de vida, talvez porque o aleitamento materno proteja passivamente a criança. Na primeira infância, a infecção é pouco específica e os sintomas de Mononucleose Infecciosa (MI), uma das primeiras doenças atribuídas ao EBV, são incomuns, porém a partir dos 10 anos é mais frequente a manifestação clássica da doença com os sintomas de MI (Ginsburg et al., 1977). Em países desenvolvidos, a infecção infantil vem decaindo, por exemplo, no Japão a seroprevalência de crianças de cinco a nove anos de idade caiu de mais de 80% em 1990 para 59% no intervalo de 1990 a 1995 (Luzuriaga & Sullivan, 2010).

Em nosso meio, na cidade de Vitória, capital do Espírito Santo, Figueira-Silva et al. (2004), estudaram 283 indivíduos de um a vinte e um anos, houve 71% de positividade para anticorpos anti-VCA e 54% de positividade para anti-EBNA, marcadores de infecção aguda e prévia pelo EBV, respectivamente.

A forma infecciosa do EBV é o vírion, composto por um genoma linear de fita dupla, que possui 120 – 180 nm de diâmetro e possui aproximadamente 100 genes

(Kieff&Rickinson, 2007). Cercando este genoma, há três camadas designadas, da mais interna à mais externa de: cápside viral, tegumento e envelope glicoprotéico.

Considerando diferença significativa no Gene Do Antígeno Nuclear do EBV (EBNA)

2. O EBV foi tipado em tipos A e B, atualmente referidos como tipo 1 e tipo 2. Estudos sorológicos relataram diferenças, entre o tipo 1 e 2, também em EBNA 3, especificamente, -3A, -3B e -3C (Sample et al., 1990). A distribuição geográfica também é desigual, sabe-se que o EBV-1 é predominante no Hemisfério Ocidental e Sudoeste da Ásia; enquanto que o EBV-2 é comum na África e Nova-Guiné.

Apesar de ser capaz de infectar outros primatas como o chimpanzé, a transmissão do EBV é de humano para humano, ocorre predominantemente por meio do contato com secreções salivares. As tonsilas palatinas são área importante para a invasão inicial do hospedeiro e funcionam como reservatório, no qual as células infectadas podem se abrigar em estado de latência (Hug et al., 2010). O EBV é eliminado mais rapidamente do sangue do que da orofaringe, e parece que esta última área é a principal fonte de contágio, sendo que coexistem altas concentrações deste vírus com pouco ou nenhum sintoma o que favorece a transmissão deste vírus por meio do beijo (Balfour et al., 2005). A saliva, então, é o principal meio através do qual ocorre a transmissão do EBV entre os indivíduos, principalmente porque as estruturas do anel de Waldeyer, especialmente as tonsilas palatinas, abrigam células infectadas que podem eventualmente liberar vírions. O aumento das tonsilas em crianças (seja por doença crônica ou por doença recorrente) está relacionado a uma quantidade aumentada de abrigo e liberação de EBV, o que declina após tonsilectomia. Portanto, crianças são importantes hospedeiras e dispersoras do vírus (Hug et al., 2010). Outro possível meio de infecção, que, no entanto, foi demonstrado em coelhos é a inoculação perioral ou intranasal, sendo que a última parece ser mais eficaz do que a primeira (Okuno et al., 2010). Há a possibilidade de o EBV ser transmitido por via sexual, porém esse é um evento com pouca



possibilidade de acontecer, mesmo entre pacientes portadoras do HIV, que por não possuírem imunidade celular efetiva, estariam mais propensos a serem infectados (Oliveira et al., 2011), portanto, essa pode ser uma via envolvida na infecção, mas que deve ser melhor investigada para que seja estabelecida como tal.

Acredita-se que, para crianças, a maioria das infecções ocorre por troca salivar através de objetos, principalmente brinquedos (Odumade et al., 2011), enquanto que para adolescentes e adultos jovens a principal forma de infecção é através da troca de saliva pelo contato oral íntimo. O EBV pode ser transmitido pelo sangue, transplante de células hematopoiéticas e de órgãos sólidos. Para os transplantados, a infecção é potencialmente fatal, em virtude da terapia imunossupressora frequentemente fatal.

O EBV é considerado um vírus linfotrópico que infecta principalmente linfócitos B. Entretanto, pode infectar células epiteliais das tonsilas e, mais raramente, linfócitos T. A penetração do EBV nas células ocorre através da ligação de glicoproteínas presentes no envelope viral, como a gp350 e a gp42 e receptores celulares. Nas células B, as glicoproteínas virais se ligam respectivamente ao CR2/CD21 e HLA classe 2; nas células epiteliais, a ligação ocorre entre as proteínas virais BMRF-2 e gH/gL e as integrinas  $\beta 1$  e  $\alpha \nu \beta 6/8$  das células epiteliais. Após a ligação entre as glicoproteínas virais e as proteínas de superfície celular, as partículas virais serão endocitadas e o envelope do vírus se funde à membrana da vesícula de endocitose liberando no citoplasma o capsídeo viral. Este é dissolvido, liberando o genoma, que migra para o núcleo onde ocorre replicação do por DNA polimerases. A invasão bem sucedida do EBV pode resultar em dois tipos de ciclos na célula: ciclo lítico e ciclo latente (Luzuriaga et al. 2010; Odumade et al., 2011).

O ciclo lítico é o que ocorre na minoria dos linfócitos B infectados, quando as células infectadas podem tornar-se linfoblastos, os quais têm a habilidade de replicar e dar origem a uma linhagem com potencial oncogênico. Os genes produzidos durante o ciclo lítico

são distintos em três classes: imediatamente precoces, precoces e tardios (Farina et al., 2005; Zhao et al., 2011). Na fase lítica, ocorre a destruição da maior parte dos linfócitos B e das células epiteliais por linfócitos T citotóxicos, e é essa destruição que pode levar à sintomatologia da doença conhecida como MI. A ativação lítica, ou a reativação em células que estavam em latência, é necessária para que ocorra a transmissão do vírus entre pessoas (Luzuriaga et al. 2010; Odumade et al., 2011).

Durante o ciclo latente, são expressos os genes de seis proteínas nucleares EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C e -LP; três proteínas latentes de membrana LMP-1, -2A e -2B e dois RNAs nucleares pequenos EBER-1 e EBER-2 (Sample et al., 1990). EBNAs e LMPs são responsáveis por converter as células B em repouso em linfoblastos, reativando assim o ciclo lítico (Zhao et al., 2011). Durante a latência, os linfócitos e células epiteliais ficam disfarçados do sistema imune, e é este ciclo que determina a persistência da infecção no hospedeiro.

## 2. Estrutura viral

O EBV em sua forma infecciosa é um vírion, que, como anteriormente citado, tem aproximadamente 120 – 180 nm de diâmetro, formado por um genoma linear de fita dupla, o qual é cercado por três camadas, designadas da mais interna para a mais externa de: cápside viral, tegumento e envelope glicoprotéico (Kieff & Rickinson, 2007). O genoma do EBV foi completamente sequenciado por Baer et al. (1985) em seu estudo “DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome” que demonstraram conter aproximadamente 100 genes.

### 2.1. Genoma Viral

Baer et al. (1985) apresentaram que o genoma do EBV é próximo a 172 quilobases e contém em torno de 86 regiões abertas (ORF), as quais são nomeadas a partir dos fragmentos de restrição *Bam*HI onde esta região está inserida. Há uma região única intercalada entre quatro regiões de repetições internas denominadas IR1 à IR4 e também entre regiões de repetição terminal (TR) que possuem em torno de 0,5kbp (Kieff&Rickinson, 2007). Apesar do genoma do EBV ser linear quando em estado de latência, assume a forma de epissomo, circular, auxiliado pelas regiões TR.

São conhecidas as sequências genômicas de linhagens celulares além do B95-8 como: AG876, P3HR-1, Raji, W91, Akata, M-ABA, Jijoye, GD1 e GD2. As únicas completamente sequenciadas são B95-8 e AG87 originadas respectivamente de um caso de MI e de um caso de Linfoma de Burkitt (LB) do Gana. Outra linhagem celular é HKNPC1, que foi apresentada pelo grupo de Kwok et al. (2012), deriva de células epiteliais do carcinoma de nasofaringe e, como foi demonstrado pelo grupo, está filogeneticamente mais próxima das cepas GD1 e GD2, que derivam de células epiteliais (Kwok et al., 2012; Zeng et al., 2005; Liu et al., 2011).

Genomas das linhagens linfóides B95-8 e AG876 são referências para diferenciar o EBV em tipos 1 e 2. Estas duas linhagens B95-8 (EBV-1) e AG876 (EBV-2) diferem em até 20% das ORF dos antígenos nucleares EBNA-3A, -3B e -3C (Sample et al., 1990). Atualmente, sabe-se que as principais diferenças genômicas entre os tipos 1 e 2 residem nos EBNA-2, -3A, -3B, -3C e -LP (Sample et al., 1990; Dambaugh et al., 1984).

O EBV difere dos demais herpesvírus pela extensa expressão gênica durante a latência infecciosa e por causar proliferação das células com infecção latente, dependendo do tipo de latência. Nesta fase, nenhum dos genes expressos na latência infecciosa tem homologia com outros herpesvírus humanos, ao contrário do que ocorre na fase lítica, durante a replicação viral. Em estado de latência, nove proteínas são produzidas como EBNA1, EBNA2, EBNA3A, -3B, -3C, EBNA-LP, e LMP1 e LMP2A, -2B, codificadas na ORF (Sample et al.,

1990). Também são produzidos micro-RNAs (mi-RNAs) que são RNAs não-codificados, têm entre 21-24 nucleotídeos de comprimento e podem fazer *downregulation* da expressão de RNA mensageiro após a transcrição. O EBV tipo selvagem expressa 17 mi-RNAs, sendo que 14 mi-RNAs se localizam nos íntrons do gene BART, mi-RNAs-BART, enquanto outros três estão em uma região adjacente ao BHRF1, sendo mi-RNAs-BHRF1. É proposto que estes miRNAs foram amplamente conservados por 13 milhões de anos. Isto sugere que os miRNAs possuem uma função essencial no ciclo lítico do EBV que foi mantida através dos tempos (Cai et al., 2006).

Dos genes imediatamente precoces da fase lítica, dois são ativadores de transcrição: BZLF1 (ZEBRA) e BRLF1 (Rta). Ambos são necessários para que se conclua o ciclo lítico (Feederle et al., 2000). Os genes precoces não estão exclusivamente envolvidos na replicação do DNA, portanto incluem os genes da DNA polimerase, o fator processador da DNA polimerase, BMRF1, o homólogo ao bcl-2 o BHRF1 e a proteína maior de ligação ao DNA, BALF2. E os genes tardios codificam predominantemente proteínas estruturais como a gp350/220, responsável pela ligação com o receptor CD21/CR2 dos linfócitos B na fase inicial de entrada do EBV nos linfócitos B.

O estudo SPINE (*Structural Proteomics In Europe*) de Tarbouriech et al. (2005) identificou que o genoma do EBV produz 86 proteínas, demonstrando que esse herpesvírus possui um dos maiores genomas entre os vírus (Johannsen et al., 2004).

## 2.2 Capsídeo Viral

O capsídeo do EBV tem uma estrutura similar ao de outros herpesvírus, como o Herpesvírus simples 1 (HSV 1), sendo uma estrutura icosaédrica, que contém 12 pentâmeros nos vértices e 150 hexâmeros na superfície. Os capsômeros, que são as unidades do capsídeo, contêm a Proteína *Major* do Capsídeo ou Antígeno do Capsídeo Viral (VCA), codificada pelo

BcLF1, utilizada como marcador tumoral de alguns cânceres relacionados ao EBV. Proteínas menores, codificadas por BDLF1 e BORF1 (Wang et al., 2011), estão presentes na cápside e formam uma estrutura tríplice. Esta estrutura tríplice juntamente com o VCA será responsável pela formação da cápside viral e essencial para a junção do capsídio (Wang et al., 2011; Henson et al., 2009).

Há ainda outras proteínas importantes para a montagem do capsídio, codificadas pelo BFRF3, a Proteína Menor da Capsídio; a Proteína do Arcabouço Interno (BdRF1) e a Protease de Maturação (BVRF2). A importância da Proteína Menor da Capsídio para a automontagem da cápside do EBV foi demonstrada por Henson et al. (2009), usando o sistema do Vetor de Expressão do Baculovírus (BEV). Nestes experimentos *in vitro*, a ausência da expressão da Proteína Menor do Capsídioreultou na incapacidade em produzir cápsides. Assim, a estrutura da cápside é organizada da seguinte forma, multímeros de Proteína *Major* do Capsídio, ligadas à estrutura tríplice e decoradas por Proteínas Pequenas da Capsídio, sendo que as Proteínas do Arcabouço direcionam essa estrutura formada entre proteínas *major*, menor e *minor* em uma estrutura icosaédrica (Henson et al., 2009).

### 2.3 Tegumento

Após a entrada na célula e a perda do capsídio o EBV ainda tem que enfrentar algumas barreiras para promover a infecção. O tegumento viral é uma das estruturas do EBV que entra em contato com as estruturas intracelular e tem papel fundamental, pois permite que o EBV não seja destruído. Uma proteína importante para impedir a destruição do EBV é a codificada pelo BNFR1. Como demonstrado por Tsai et al. (2011) ela inibe a capacidade da proteína Daxx interagir com a proteína ATRX, e consequentemente a formação do complexo Daxx-ATRX. Estas proteínas Daxx e ATRX são corpos nucleares PML (PML-NB), que inibem a

expressão de proteínas virais. Durante a infecção lítica, o EBV é responsável pela ruptura do PML-NB, enquanto na infecção latente os epissomos de EBV são segregados distantes do PML-NB. Outra função provavelmente exercida pelo tegumento é a fosforilação que é importante para o controle do ciclo celular, essa função é exercida pela proteína quinase codificada por BGLF4 que fosforila a proteína BMRF1, uma proteína da fase lítica, e o complexo formado entre BGLF4-BMRF1 parece agir sobre a replicação do DNA no ciclo lítico (Asai et al., 2006). Outra atividade que parece ser exercida pelo tegumento é a ubiquitinação, através da proteína codificada pelo gene BPLF1 (Whitehurst et al., 2009), a ubiquitinação é um processo importante para o ciclo celular.

#### 2.4 Envelope

O envelope do EBV tem fundamental importância para a correta invasão das células pelo vírus. O EBV pode infectar células dendríticas foliculares, músculo liso, células T e NK (Kieff&Rickinson, 2007); mas a infecção de células epiteliais e células B são mais expressivas.

Para infectar células B, há basicamente duas etapas fundamentais, a ligação e a fusão do envelope viral à membrana da célula. A proteína gp350/220 do EBV se liga ao CD21/CR2, presente na superfície de células B, esta ligação estimula a endocitose e a fusão irá ocorrer em um meio de baixo pH (Wang et al., 1998), essa fusão será mediada por três ou até quatro glicoproteínas, que são: gB, gL, gH e gp42. A proteína gH, gp85, é considerada a principal para a fusão, enquanto gL, chaperona da proteína gH, que ajuda a transportar esta para fora do retículo plasmático (Tsai et al., 2011), gp42 forma com gH e gL um complexo responsável pela fusão do envelope viral. A participação de gp42 no processo de fusão só ocorre em células B que tem um receptor específico para esta proteína. Enas células epiteliais não há este receptor e a presença de gp42 parece prejudicar a fusão neste tipo celular, o que sugere

que o gp42 exerce uma influência no tropismo do vírus pela célula (Wang et al., 1998a; Borza et al., 2004; Wang et al., 1998b).

A infecção das células epiteliais também se inicia com a ligação de gp350/220 e CD21/CR2. Porém a fusão não conta com a proteína gp42, pois as células epiteliais não a possuem. Parece haver um receptor ainda não identificado, que se liga ao complexo formado apenas por gH/gL, e a ligação de gH/gL. Aligação deste complexo (gH/gL) ao receptor aumentou com a redução dos níveis de gp42 (Wang et al., 1998a). Estudos devem ser feitos para esclarecer a natureza desse receptor de células epiteliais chamado por Borza et al. (2004) de gHgLR. Outro mecanismo independente de receptor que auxilia na infecção epitelial é através da IgA polimérica (pIgA). Este anticorpo é direcionado ao gp350 e aumenta a habilidade do vírus de infectar células epiteliais (Sixbey et al., 1992).

**Figura I. Modelo da estrutura do EBV.**

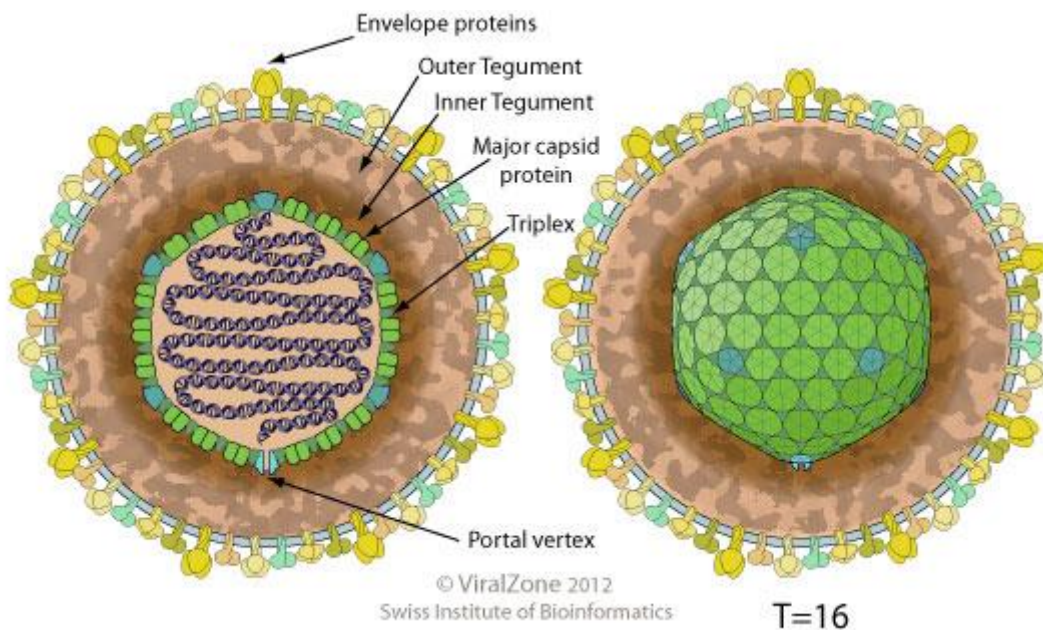


Figura 1. Representação gráfica da estrutura do EBV, das setas mais externas para mais internas temos: proteínas do envelope, tegumento externo, tegumento interno, proteínas maiores do capsídeo, triplice e vértice portal.

FONTE: adaptada de Viral Zone (2013).

### 3. Mecanismos de infecção pelo Epstein-Barr vírus

O EBV infecta diversos tipos celulares incluindo linfócitos, células epiteliais e mesenquimais. Destes, as células B compreendem o maior compartimento infectado e também o mais estudado. Como observado em infecções por outros herpesvírus, a perpetuação da infecção reside na capacidade do vírus estabelecer duas fases de infecção: a latente com escape do controle imunológico e a reativação/replicação com infecção de novas células.

**Figura II. Modelo de infecção pelo EBV em humanos.**

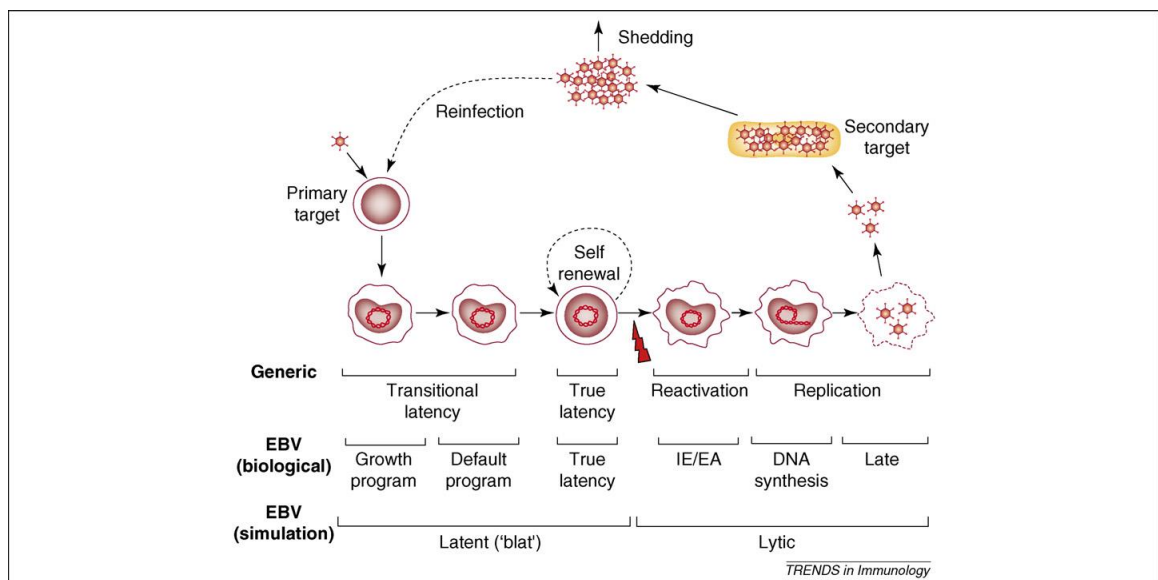


Figura 2. Vírus livre infecta células que passam por diversos estágios de latência (latência transitória) até que se estabelece a latência final cessando a expressão de proteínas virais. Estímulos externos levam à reativação com replicação do DNA e produção de vírus infectantes e morte celular. Estes infectam células adjacentes que inicialmente expressam fatores de transcrições precoces que geram antígenos precoces (componentes do complexo de replicação viral), empacotamento do vírus (antígenos tardios) e morte celular (antígenos líticos).  
 FONTE: adaptada de Thorley-Lawson (2008).



A susceptibilidade à infecção de determinado tipo celular está diretamente relacionada à expressão de proteínas que funcionam como receptores para o EBV. O estudo de Shannon-Lowe et al. (2006) sugere que a replicação inicial em orofaringe ocorre em células B da orofaringe e como dito anteriormente, o CD21 no contexto do MHC é fundamental para a infecção. As células B funcionam como reservatório *in vivo* mantendo a infecção em estado de latência. Estudos *in vitro* indicam que o vírus infecta células B *naive* que podem se diferenciar no Centro Germinativo (CG) em células B de memória iniciando infecção de longa duração. Mas, estudos *in vivo* apontam que a passagem pelo CG parece não ser importante, e que o vírus pode infectar diretamente células B *naive* de memória (Chaganti et al., 2009). Acredita-se que as células B de memória circulantes (CD27+ e IgG-) de indivíduos infectados pelo EBV podem entrar no ciclo lítico e, através da circulação sanguínea alcançar o Anel de Waldeyer e liberar vírions para a saliva ou infectar células epiteliais (Al Tabaa et al., 2009).

A infecção de células B não é absolutamente necessária para infecção de células epiteliais. Entretanto a infecção de linfócitos aumenta a susceptibilidade de células epiteliais *in vitro*. Em células epiteliais outros mecanismos de infecção, independentes de CD21, como integrase o contato de célula-a-célula parecem explicar a susceptibilidade à infecção. Células, que não expressavam receptor CD21 e pIgA, colocadas em contato por três dias com outras células infectadas passaram a expressar EBNA1, em 18 das 21 células. Enquanto que este índice cai quando as células cultivadas com sobrenadantes contendo apenas o vírus (Imai et al., 1998).

Em paciente com MI ainda se questiona a participação das células epiteliais na dispersão vírus, em estudo com hibridização *in situ* de descamado de células da orofaringe, não foi encontrada evidência de fase lítica nessas células o que pode refutar a participação dessas células, na dispersão do vírus durante a MI (Niedobitek et al., 2000).

As cepas virais também parecem estar envolvidas nos mecanismos de infecção, tendo em vista que algumas cepas parecem ser mais eficientes do que outras em promover e manter a infecção. Múltiplas cepas podem infectar indivíduos imunocompetentes ou imunodeficientes, e inicialmente parece haver sobreposição de algumas cepas em relação a outras e estabelecimento de cepas diferentes entre o sangue e a cavidade oral. Mas com o tempo pode ocorrer também cepas semelhantes nestes dois locais (Sitki-Green et al., 2003). E o acompanhamento dessas cepas pode ser útil para se observar cepas mais virulentas e até mesmo com maior potencial oncogênico.

#### 4. Proteínas virais, RNA viral e papel patogênico

A patogenese do EBV refere-se à capacidade que esse vírus possui de dar origem à doença. A doença primária causado por este vírus é a MI, doença auto-limitada, de caráter benigno e que raramente cursa com complicações. No entanto, o interesse em estudar a infecção pelo EBV aumentou muito a partir do conhecimento de sua associação com neoplasias malignas tais como: LB, Linfoma de Hodgkin (LH), Linfomas T (LT), Linfomas de Células NK (LNK), Linfomas de Grandes Células B (LGCB) associado ao EBV, Carcinoma de Nasofaringe (CNF), Leiomiossarcomas Pediátricos. Portanto, estudar os mecanismos de escape imunológico, indução de proliferação e imortalização celular têm grande importância para entender o papel desta infecção na oncogênese.

A capacidade que oEBV tem de imortalizar células está diretamente relacionada com alterações genéticas, como encurtamento de telômeros, rearranjos cromossômicos e expressão de cariótipo anormal (Okubo et al., 2011).

Além disso, algumas moléculas virais têm sido associadas a este potencial oncogênico e são estas: LMP1, LMP2 (LMP2A e LMP2B), EBNA1, EBNA2, EBNA3 e micro-RNAs (mi-RNAs).

#### 4.1 LMP1

LMP1 é uma proteína da membrana plasmática que mimetiza TNFR, CD40, interagindo, assim, com TRAF, especialmente TRAF6 e JAK3 quinase. Esta proteína possui forte associação com o desenvolvimento de neoplasias induzidas pelo EBV. Esta proteína não afeta a diferenciação celular, suas ações são exercidas através de vias de sinalização por Akt, NFkB e aumento de IL10 que leva à ativação de Stat 3, e decréscimo de p27 (Shair et al., 2007), inibição da ativação de p53 (Liu et al., 2005), além da ativação de vias de tradução como MAPK, PIK3, JAK3/STAT. Essas ativações de sinais ocorrem através das regiões terminais dessa proteína, as regiões CTAR1, CTAR2 e CTAR3. O LMP1 ajuda as células neoplásicas a escaparem do sistema imune através da inibição TLR9, o que ocorre através da ativação da via NFkB (Fathallah et al., 2010). Além de agir na oncogenese, LMP1 facilita a disseminação dos cânceres através da indução de MUC1, que é ativada pela ligação à STAT1 e STAT3, diminuindo a adesão celular (Kondo et al., 2007).

#### 4.2 LMP2

Estudo com células knockout em LMP2A e/ou LMP2B, indicam que LMP2A é essencial para a correta ativação e proliferação celular, enquanto que LMP2B aparentemente não é importante para a ativação de células B (Wasil et al., 2013). LMP2A bloqueia BCR, Receptor de Células B, impedindo a entrada no ciclo lítico e apoptose. Consequentemente a LMP2A promove a sobrevivência celular (Mancao et al., 2007). A LMP2B interfere na ação de LMP2A, pois funciona como um regulador negativo de LMP2A, portanto aumenta a troca do EBV de ciclo latente para o lítico (Rechsteiner et al., 2008).

### 4.3 EBNA1

EBNA1 é expresso em todas as células infectadas. E, possui algumas funções que podem levar à oncogênese como aumento de proteínas supressoras da apoptose (Lu et al., 2011) indução de aberrações cromossômicas e quebras da fita dupla de DNA são realizadas através da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (Gruhne et al., 2009). Adicionalmente, EBNA1 parece ser responsável pela regulação da transcrição de genes defeituosos (Altmann et al., 2006). Apesar de ter essas funções EBNA1 não é essencial para o desenvolvimento de linhagens linfoblásticas (Humme et al., 2003).

### 4.4 EBNA2

EBNA2 é um antígeno amplamente correlacionado com o papel oncogênico do EBV. Ele aumenta a expressão de c-myc mimetizando os efeitos da sinalização por Notch, que leva não só a proliferação celular, como, também, a efeitos antiapoptóticos, através da ligação ao Nur77 (Lee et al., 2002). Seus aminoácidos 3 a 30 estão associados à expressão de LMP1, e, portanto na sobrevivência de linhagens linfoblásticas (Gordadze et al., 2004).

### 4.5 EBNA3

O grupo de antígenos EBNA3 é composto por EBNA3A, -3B e -3C. EBNA3A e -3C. Enquanto os EBNA3A e -3C estão associados à transformação dos linfócitos B em linfoblastos, que -3B não parece ter associação.

### 4.6 microRNAs (miRNAs)

MiRNAs do locus BHRF1 estão associados à progressão e proliferação celular e coibição da apoptose (Seto et al., 2010; Feederle 2011). Além desse locus, em células

infectadas pelo EBV o supressor tumoral miRna, miR-34, tem ação favorável ao crescimento tumoral (Forte et al., 2012). Além de miR-34a, miR-21 e miR-155 também estão associados à oncogênese. Apesar de inicialmente não serem associado à oncogênese, os miRNAs produzidos pelo locus BART têm sua expressão aumentada nos padrões de latência I e II, associados à tumores como LB e LH, portanto, é provável que esse locus tenha alguma função no desenvolvimento tumoral (Qiu et al., 2011).

#### 4.7 EBERs

A modulação da expressão de alguns destes antígenos em células infectadas nas diversas condições levou ao reconhecimento do padrão de diferentes tipos de latência viral. Importante instrumento para o diagnóstico de doenças.

#### 4.8 Padrões de Latência do EBV

O EBV ao levar uma célula ao ciclo latente pode gerar três padrões de latência diferentes, os padrões de latência 1, 2 ou 3. Cada um desses padrões tem características próprias com diferentes expressões moleculares, e também estão diferentemente associados à neoplasias (Quadro 1).

**Quadro 1. Moléculas virais envolvidas com a patogênese de neoplasias malignas e participação nos perfis de latência.**

<b>Tipos de Latência</b>	<b>Moléculas expressas</b>	<b>Neoplasias malignas associadas</b>
<b>Tipo 1</b>	EBNA1, EBERs, BARTs e BARTs miRNAs	LB
<b>Tipo 2</b>	EBNA1, LMP1, LMP2, EBERs, BARTs e BARTs miRNAs	CNF, LH
<b>Tipo 3</b>	EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, EBERs	Associadas à imunossupressão

FONTE: adaptada de KIEFF et al. (2010).

## 5. Oncogênese

Devido ao potencial que a infecção pelo EBV tem de imortalizar células, e levar a proliferação celular, ele é considerado hoje um vírus oncogênico do grupo I. A distribuição geográfica das neoplasias associadas a esta infecção é notável. Enquanto LB associado ao EBV é endêmico na população pediátrica africana, na Europa e América do Norte ele é menos frequente e apenas 20% dos casos exibem infecção viral.

Da mesma forma linfomas NK nasal é muito mais frequente na população chinesa, a infecção pelo EBV é uma constante. Na Ásia um tipo particular de linfoma associado ao EBV foi reconhecido recentemente pela OMS “Linfoma de grandes células do idoso associado ao EBV”. Na Venezuela linfomas cutâneos pediátricos associados ao EBV foram cunhados de “hidroavacciniformesimile”, e, apesar de aceitos pela OMS permanecem em estudo. Em nosso meio os Linfomas de Burkitt e Linfomas de Hodgkin pediátricos exibem em cerca de 90% associação viral (Araújo et al., 2006). Apenas infecção pelo EBV não justifica isoladamente a gênese de linfomas, pois o vírus é cosmopolita, e pequena parcela desta população desenvolve doenças neoplásicas.

Entretanto alguns fatores indicam que a infecção ocorreu antes da transformação maligna, fortalecendo o papel oncogênico do vírus, são eles: a) a monoclonalidade da infecção viral em células neoplásicas, b) indução de linfoproliferação atípica associadas ao EBV e linfomas em pacientes imunossuprimidos; c) o aumento de até 100x destes linfomas em pacientes HIV+. No nosso meio, os linfomas pediátricos associados à infecção pelo EBV são linfomas cujas células reconhecidamente participaram da reação do CG. Assim, é importante estudar a presença de células infectadas pelo EBV em tonsilas de crianças, considerada porta de entrada do vírus no organismo.

## **IV. METODOLOGIA**

### **DESENHO DO ESTUDO**

Este trabalho foi realizado em duas etapas, a primeira constituída de revisão da literatura de trabalhos originais que analisem estrutura viral, mecanismos de infecção, mecanismos patogênicos e perfil histopatológica da infecção pelo EBV em tecido linfóide não neoplásico e uma segunda etapa que foi um estudo retrospectivo observacional de lâminas de tonsilas arquivada no serviço de patologia, de pacientes pediátricos cuja tonsilectomia havia sido enviada ao serviço de patologia para exame anátomo-patológico. Estas tonsilas foram alvo de projeto anterior não concluída a análise microscópica, durante o qual foi realizada a pesquisa da infecção pelo EBV por hibridização molecular.

### **PRIMEIRA ETAPA**

A revisão da biografia foi realizada utilizando os bancos de dados eletrônicos: PUBMED, MEDLINE, LILACS, SCIELO e SCOPUS e os artigos identificados como importantes foram recuperados na íntegra pelo portal de periódicos CAPES. Foram incluídos artigos publicados entre 2003 e julho de 2013, escritos em inglês, português ou espanhol. Foram excluídos artigos que não preencheram os critérios de inclusão e relatos de caso. Estes critérios não foram usados para artigos considerados de valor histórico.

### **ESTRATÉGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS ARTIGOS**

As seguintes palavras-chaves foram utilizadas para busca dos artigos no banco de dados: "EBV" OR "Epstein-Barrvirus" AND "Tonsils" OR "Tonsil". Além disso, foi feita uma busca com a combinação das seguintes palavras-chave: "EBV" e

"InfectiousMononucleosis", "EBV" e "Lymphomas", "EBV" e "Epidemiology", "EBV" e "Genome", "EBV" e "Pathogenesis", "EBV" e "Capsid", "EBV" e "Tegument", "EBV" e "Envelope" e "EBV" e "Infection". Os unitermos utilizados estão explicitados no Quadro 1.

**Quadro 2. Unitermos utilizados nos diferentes bancos de dados.**

Banco de Dados	Unitermos				
PUBMED	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	"tonsilsortonsil" *
SCOPUS	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	"Tegument",
LILACS	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	"Envelope"
	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	"Genome"
	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	"Pathogenesis"
	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	"InfectiousMononucleosis"
	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	Germinal Center *
	"EBV" Barrvirus"	OR	"Epstein- Barrvirus"	AND	Lymph node *

## ANÁLISE DOS ARTIGOS

Os artigos foram selecionados pelos títulos e resumos e constituíram a primeira etapa do estudo. Em relação a infecção pelo EBV em tecido linfóide foram selecionados os artigos que identificaram a infecção no tecido.



## SEGUNDA ETAPA DO ESTUDO

### CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa – HUPES em 01 de dezembro de 1999. O parecer encontra-se nos anexos. Além disso, por ter sido aprovado em época anterior à criação da Plataforma Brasil, o projeto foi resubmetido para apreciação pelo Comitê de Ética e Pesquisa – FMB, tendo sido reaprovaado com o número CAAE 09769013.3.0000.5577.

### OBJETO DO ESTUDO

O objeto do estudo foram tonsilas de crianças cujo material foi enviado para estudo anátomo-patológico entre os anos 1999 e 2005, no serviço de patologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES).

### METODOLOGIA DA OBTENÇÃO DE DADOS

Os dados serão extraídos a partir de estudos de microcópia óptica desenvolvidos no Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) de 120 lâminas de tonsilas pediátricas.

### PACIENTES

Crianças abaixo de 14 anos, submetidas à tonsilectomias por indicação da clínica de otorrinolaringologia, sem qualquer interferência ou conhecimento da indicação do

procedimento, cujo material foi encaminhado ao serviço de patologia do HUPES entre 1999 e 2005 foram incluídas retrospectivamente à época. Os prontuários não foram revistos nem dados clínicos estudados. Após o resultado do exame anatomo-patológico emitido por diversos patologistas, todas as lâminas foram revisadas e confirmado o diagnóstico de hiperplasia linfóide reacional. Para cada caso foi cortado uma secção de parafina/tonsila, confeccionada uma lâmina de tecido parafinizado e enviado ao Instituto de Patologia do Hospital Universitário da Frei Universität Berlin. Estas lâminas foram devolvidas um ano após o envio com resultados anotados em lista.

#### TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE EBV

Foi realizada segundo protocolo estabelecido por Araújo et al. Esta técnica permite a detecção do RNA viral possibilitando a localização da célula infectada neste tecido. Devido a presença de EBER em um grande número de cópias ( $10^7$  por célula) em quase todas as células infectadas pelo EBV a detecção desta molécula de RNA pode ser realizada por sondas não isotópicas e é considerada padrão ouro para a identificação de células infectadas em tecido.

#### ANÁLISE DAS LÂMINAS

A identificação das células EBER positivas foi realizada por microscopia ótica, sendo que as células positivas exibiam uma coloração nuclear vermelha. Algumas lâminas exibiam artefato de difusão com tonalidade mais clara e alguma exibiam descoloração da hematoxilina, a contracoloração de fundo.

Destas lâminas foram extraídas as seguintes informações, número de células infectadas em um campo de menor aumento (50X) em local de maior densidade de células infectadas (correspondendo a uma área de 2 milímetros quadrados), número de células

infectadas em 10 campos de grande aumento (correspondendo a uma área de 0,2 milímetrosmilímetros quadrados) e localização das células positivas (região interfolicular (IF), centro-germinativo (GC) ou intra-epitelial. Padrão de distribuição no centro germinativo (ocupando todo o centro-germinativo, ocupando a periferia, sem distribuição específica).

#### ANÁLISE QUANTITATIVA – “SCORE”

Para melhor homogeneidade, após a análise das lâminas, determinou-se uma quantificação subjetiva com três graus. Baixa densidade (de células isoladas até 10 células positivas em todo o tecido); moderada densidade (de 2 a 5 células/campo de maior aumento e de 11 até 20 células em 10 campos de menor aumento); alta densidade (acima de 5 células/campo de maior aumento e acima de 20 células em 10 campos de menor aumento). Por existir grande variação no número de células positivas/campo foi definido aleatoriamente que mais de 50 células infectadas/campo de menor aumento representava um “hot spot”.

## V. RESULTADOS

### 1. ANÁLISE QUALITATIVA DAS LÂMINAS

Das 120 lâminas hibridizadas e arquivadas, 4 estavam em péssimo estado de conservação e foram excluídas da análise, duas lâminas estavam em duplicata e três estavam rotuladas como controle da reação, exibindo numerosas células positivas com padrão de infecção semelhante a mononucleose. Assim, um total de 111 lâminas de tonsilas de crianças e três controles foram analisadas.

### 2. FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO EBV EM TONSILAS PALATINAS

Em 41 dos 111 casos(36,9%) foram identificadas células positivas para o EBV, enquanto que em 70 (63%) lâminas não foram observadas células positivas (Quadro 1, Gráfico 1). Os 3 casos de mononucleose utilizados como controle exibiam numerosas células positivas com padrão mononucleose-simile.

### 3. DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS INFECTADAS NAS TONSILAS

Dentre os 41 casos positivos para EBV 39 (95,1% do total de lâminas positivas) apresentaram expressão de EBER na zona interfolicular (IF), e 8 (19,5%)em centro germinativo (CG)(Quadro 1, Tabela 1). Em todos os casos com células positivas em CG (8 lâminas) havia expressão em apenas um CG, e apenas 2 lâminas apresentaram infecção limitada aos CG, sem células positivas em região IF ou apenas com células isoladas (Quadro

1). Em 16 dos casos positivos (36,4% do total) os linfócitos positivos permeavam o epitélio (Foto 1 e 2), e em outras 4 (9%) os linfócitos estiveram próximos ao epitélio (Quadro 3).

Dentre os 3 casos mononucleose-símile houve 100% de expressão em IF e CG.

#### 4. MORFOLOGIA DAS CÉLULAS INFECTADAS NAS TONSILAS

Na maior parte dos casos a morfologia correspondeu a linfócitos pequenos, semelhantes aos normais. Dentre os casos controle, identificados como mononucleose-símile houve células transformadas, aumento do tamanho de duas a três vezes um linfócito normal.

#### 5. QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS INFECTADAS EM TONSILAS

Utilizando os índices de baixa, moderada e alta densidade de células infectadas previamente explicito na metodologia 20 dos 41 casos positivos (48,8%) exibiram baixa densidade de infecção (Foto 3), 11 (26,8%) moderada e 10 (24,4%) alta densidade (Foto 4). Salienta-se, entretanto, uma grande variação em relação à localização das células nos diversos compartimentos teciduais. Quando a infecção se restringia ao compartimento interfolicular não existiam “hot spots” (50 células positivas/campo). Entretanto, os casos com positividade em centro-germinativo exibiram por vezes um único CG positivo com “hot spot” (em um caso) (Foto 6) e sem qualquer célula ou apenas células isoladas nas demais áreas, e nos demais casos em que houve associação da zona IF e CG houve quatro “hot spots”.

Nos casos mononucleose-símile, houve alta densidade da infecção, e duas destas lâminas (66,7%) apresentavam “hot spots”.

**Quadro 3. Discriminação dos casos por número máximo de células EBER positivas por campo de menor aumento e dez campos de maior aumento, e local da expressão de EBER.**

Número do caso	Número máximo de células/campo de menor aumento	Local	Número de células/10 campos de maior aumento
MG284/98	3	IF	12
H14623/96	1	IF	2
1278/99	2	IF	13
MG218/98	3	IF	8
MG121/98	3	IF	6
1489/99	3	IF	20
MG288/98	1	IF	6
MG286/98	3	IF	13
MG235/98	0	0	0
3130/99	0	0	0
3195/91	1	IF	2
1125/99	1	IF	2
H7679/96	21	IF, CG	>100
MG352/99	0	0	0
2410/99	1	IF	1
2949/99	0	0	0
H12364/96	2	IF	9
4307/99	1	IF	2
MG212/98	1	IF	4
MG297/98	0	0	0
1043/99	0	0	0
1039/99	3	IF	8
647/99	1	IF	2
436/99	2	IF, CG	10
561/99	0	0	0
MG362/99	1	IF, CG	2
2603/99	1	IF	1
MG244/99	1	IF, CG	2
MG291/98	0	0	0
4613/99	3	IF	7
MG400/98	0	0	0
MG184/98	0	0	0
MG564/99	0	0	0
MG261/98	1	IF	1
MG287/98	0	0	0
2741/99	0	0	0

CONTINUA

Quadro 3. [continuação].

MG269/98	0	0	0
MG186/98	0	0	0
927	10	IF	30
1413/99	0	0	0
2623/99	8	IF	30
MG181/98	8	IF	27
MG295/99	0	0	0
MG264/99	0	0	0
40411/99	0	0	0
1412/99	0	0	0
MG226/99	0	0	0
MG315/99	0	0	0
2812/99	1	IF	3
MG224/99	0	0	0
2903/99	0	0	0
3700/99	0	0	0
H1902/06	0	0	0
MG241/98	0	0	0
2505/99	0	0	0
H7539/96	0	0	0
H10672/96	0	0	0
H14819/96	0	0	0
H9530/96	0	0	0
3650/99	1	IF	3
MG240/99	0	0	0
MG4801/98	0	0	0
MG273/98	0	0	0
MG526/99	0	0	0
MG182/98	0	0	0
MG203/98	1	IF	1
501/99	1	IF	6
500/99	0	0	0
H12082/96	0	0	0
H6932/96	0	0	0
H13253/96	0	0	0
H9833/96	1	IF	2
H15218/96	1	IF	3
H6245/96	0	0	0
H862/96	0	0	0
H11237/96	0	0	0

CONTINUA

## Quebra 3. [continuação]

H6659/96	0	0	0
H3769/96	40	IF	>100
MG274/98	0	0	0
4616/99	0	0	0
4124	0	0	0
H4418/96	0	0	0
H970/96	0	0	0
H11016/99	1	IF	1
H10420/96	0	0	0
H8853/96	2	IF	4
H19267/96	0	0	0
H1224/96	0	0	0
H4577/96	0	0	0
H12154/96	0	0	0
H1400/96	0	0	0
HG588/99	0	0	0
4198/83	0	0	0
403/99	0	0	0
MG192/98	0	0	0
283/99	0	0	0
981/99	11	IF	40
MG541/99	0	0	0
67199	0	0	0
2478/99	16	CG	18
5582/99*	>100	CG	APENAS CG MARCADO
919/99**	18 EM CG, 4 EM IF	IF, CG	
H15932/99	0	0	0
H1810/99	1	IF	1
H6018/99	0	0	0
H9879/99	0	0	0
H15817/99	0	0	0
H17174/99	0	0	0
H1715/99	0	0	0
H8471/99	0	0	0
H9311/99	>100	IF, CG	>100
H5042/94***	77	IF, CG	>100
H1224/94***	>100	IF, CG	>100
H5042/99***	40	IF, CG	>100

CONTINUA



**Quadro 3. [continuação].**

**\*A lâmina 5582/99 não possui contagem de células positivas em 10 campos de maior aumento porque foi positiva exclusivamente em um centro germinativo.**

**\*\*A lâmina 919/99 apesar de possuir células em região IF era marginal ao CG, portanto, a contagem de células positivas em 10 campos de menor aumento não foi realizada por impossibilidade de garantir fidelidade aos resultados encontrados.**

**\*\*\*Prováveis casos de MI**

**Quadro 4. Lâminas excluídas.**

<b>Número do caso</b>	<b>Motivo da exclusão</b>
<b>MG240/98</b>	<b>PÉSSIMO ESTADO DE CONSERVAÇÃO</b>
<b>MG207/98</b>	<b>PÉSSIMO ESTADO DE CONSERVAÇÃO</b>
<b>MG251/99</b>	<b>PÉSSIMO ESTADO DE CONSERVAÇÃO</b>
<b>MG294/98</b>	<b>PÉSSIMO ESTADO DE CONSERVAÇÃO</b>
<b>MG284/98*</b>	<b>CASO DUPLICADO</b>
<b>MG269/98*</b>	<b>CADO DUPLICADO</b>

**\*As lâminas MG284/98 e MG269/98 estavam duplicadas, portanto, foram consideradas para análise apenas aquelas que apresentavam maior expressão celular de EBER.**

**Quadro 5. Dados encontrados em lâminas positivas.**

<b>Número do caso</b>	<b>Descrição</b>
<b>MG284/98</b>	<b>CÉLULAS POSITIVAS PRÓXIMAS AO EPITÉLIO</b>
<b>H14623/96</b>	<b>CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO</b>
<b>1278/99</b>	<b>MARCAÇÃO HETEROGÊNEA, CÉLULAS POSITIVAS EM MANTO E EPITÉLIO</b>
<b>MG218/98</b>	<b>MARCAÇÃO HETEROGÊNEA, CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO</b>
<b>MG121/98</b>	<b>MARCAÇÃO HETEROGÊNEA, CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO</b>
<b>1489/99</b>	<b>MARCAÇÃO HETEROGÊNEA, CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO</b>

**CONTINUA**

## Quebra 5. [continuação].

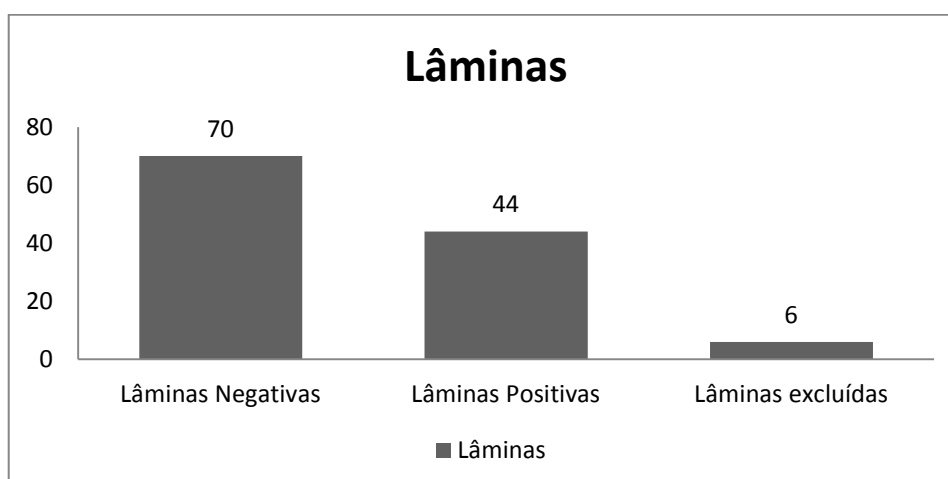
<b>MG288/98</b>	<b>CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO</b>
<b>MG286/98</b>	CÉLULAS EM CRIPTA DO EPITÉLIO
<b>3195/91</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO
<b>1125/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO
<b>H7679/96</b>	PEQUENAS CÉLULAS EM CG, DENSAMENTE POVOADA
<b>2410/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO
<b>H12344/96</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO
<b>4307/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
<b>MG212/98</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
<b>1039/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO DE CRIPTA
<b>647/99</b>	CÉLULAS PRÓXIMAS AO EPITÉLIO
<b>436/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO E PERIFERIA DE CG
<b>MG562/99</b>	CÉLULAS NÃO APARENTAM ESTAR EM PROLIFERAÇÃO
<b>2603/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
<b>MG244/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO, EPITÉLIO APARENTEMENTE ÍNTEGRO, CÉLULAS AGRUPADAS
<b>4613/99</b>	CÉLULAS PRÓXIMAS AO EPITÉLIO
<b>MG261/98</b>	CÉLULAS PRÓXIMAS AO EPITÉLIO
<b>927</b>	MARCAÇÃO HETEROGÊNEA
<b>2623/99</b>	MARCAÇÃO HETEROGÊNEA
<b>MG181/98</b>	CÉLULAS POSITIVAS AGRUPADAS
<b>2812/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
<b>3650/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
<b>MG203/98</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
<b>501/99</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO
<b>H9833/96</b>	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR

CONTINUA

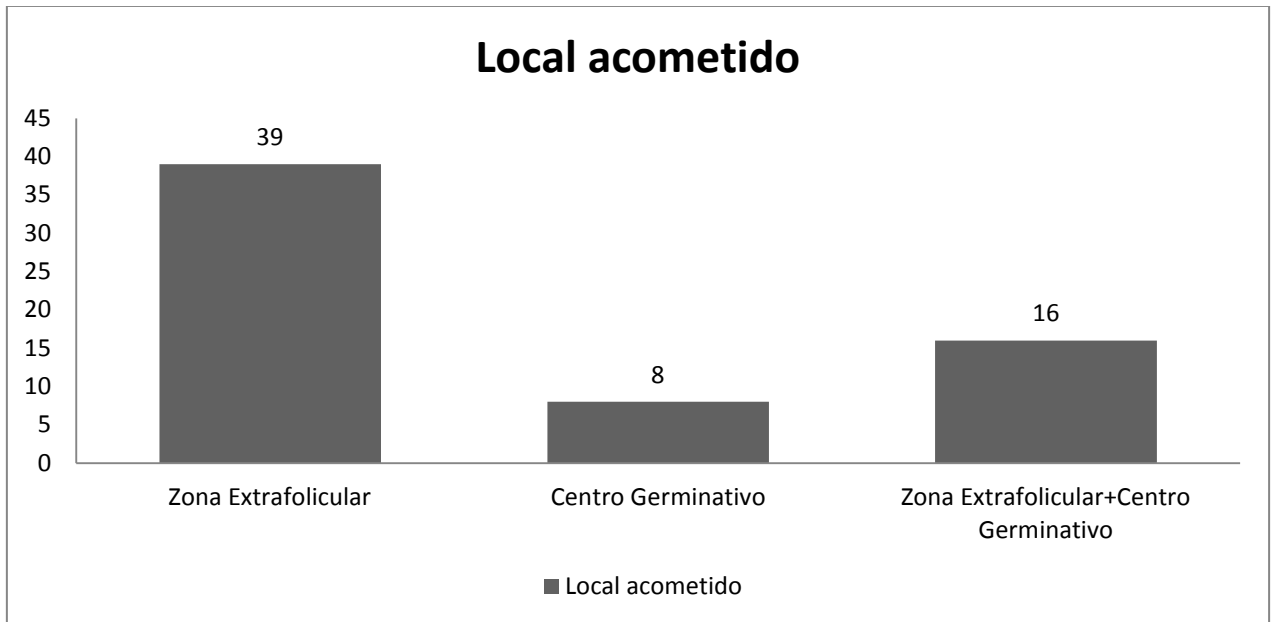
## Quebra 5. [continuação].

H15218/96	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
H3769/96	CÉLULAS POSITIVAS SEM TRANSFORMAÇÃO
H11016/96	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
H8853/96	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
981/99	CÉLULAS POSITIVAS EM EPITÉLIO
2478/99	APENAS UM CG MARCADO, CÉLULAS APENAS NESTE CG
5582/99	APENAS UM CG MARCADO, CÉLULAS APENAS NESTE CG
919/99	18 CÉLULAS POSITIVAS EM MAIOR AUMENTO EM CG E 4 POSITIVAS EM IF EM MAIOR AUMENTO
H1810/99	CÉLULAS POSITIVAS EM REGIÃO INTERFOLICULAR
H9311/99	TODAS AS ÁREAS POSITIVAS, HOMOGÊNEA
H5042/99	CÉLULAS POSITIVAS TRANSFORMADAS
H1224/94	CÉLULAS POSITIVAS TRANSFORMADAS, PADRÃO MONONUCLEOSE-SÍMILE
H5042/94	CÉLULAS POSITIVAS TRANSFORMADAS, PADRÃO MONONUCLEOSE-SÍMILE

Gráfico 1. Colunas apresentando quantidade de lâminas negativas, positivas e excluídas.



**Gráfico 2. Colunas apresentando quantidade de lâminas com expressão de EBER em zona extrafolicular, centro germinativo ou ambos em lâminas infectadas.**



## VI. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão morfológico da infecção pelo vírus de Epstein-Barr em tecido linfóide não neoplásico (tonsilas palatinas) de indivíduos menores de 18 anos. Para tanto, lâminas submetidas à hibridização molecular para o RNA do EBV não codificante e localizado no núcleo (EBERs) foram analisadas quanto a positividade, localização, densidade e morfologia das células infectadas. A frequência da infecção em tonsilas foi de 39%, sendo que de acordo com o padrão por nós estabelecido na metodologia, 48,8% apresentavam baixa densidade de infecção, 26,8% moderada e 24,4% alta densidade.

O primeiro estudo acerca do padrão de infecção pelo EBV em tecido linfóide não neoplásico foi realizado por Niedobitek et al. (1992). Estes autores investigaram 72 linfonodos não neoplásicos (reacionais), associados a várias condições e 3 tonsilas de Mononucleose Infecciosa (MI), obtendo um índice de infecção média de 58%. Este índice variou de 28% (linfonodos de esvaziamento axilar de mastectomias) a 100% nas tonsilas de MIe em linfonodos de pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A maioria dos casos exibia baixa densidade de células infectadas na zona interfolicular, e apenas as tonsilas de MI exibiram expansão da zona IF à custa de grande número de linfoblastos infectados (células transformadas). Semelhante a este estudo, observamos infecção pelo EBV principalmente na Zonta interfolicular e apenas os controles exibiam aspecto morfológico semelhante ao descrito em MI com células transformadas.

As características morfológicas da infecção tonsilar pelo EBV foram melhor estudadas em pacientes com MI, forma de infecção primária do EBV. Segundo Anagnostopoluset al. (1995) tonsilas com IM exibem hiperplasia folicular, expansão das zonas interfoliculares as quais contêm hiperplasia de células linfóides polimórficas com linfócitos transformados que variam de tamanho médio a grande, imunoblastos, células de Reed-Sternberg(RSC),

plasmócitos em diferentes estágios de diferenciação e necrose. Em 3 de nossas lâminas (6,8%) encontramos células grandes e transformadas, semelhantes a MI, nos 41 casos positivos restantes (93,18% dos casos positivos) tratava-se provavelmente de infecção latente persistente. Entretanto, apenas a sorologia concomitante poderia ajudar a determinar a fase de infecção, se primária ou persistente.

As descrições morfológicas do padrão de infecção pelo EBV em pacientes com MI é escassa, principalmente porque não há indicação cirúrgica na fase aguda da doença, exceto em casos de obstrução de orofaringe ou suspeita equivocada de linfoma. Infelizmente, as características morfológicas da MI podem simular linfomas de grandes células B de tonsilas. Segundo Childs et al. (1987) as características mais importantes que diferenciam essas duas entidades são a presença de folículos reativos, expansão paracortical com fundo polimórfico composto de linfócitos reativos ou transformados, preservação da arquitetura da reticulina na MI, enquanto linfomas exibem apagamento e fusão da trama reticulínica, proliferação imunoblástica sem folículos reativos. Essas últimas características não foram encontradas no presente estudo e em apenas 3 casos observou-se características de MI, sendo que os demais exibiram apenas hiperplasia folicular linfoide, características indistintas e consideradas reacionais.

Em geral estudo fenotípico das células infectadas mostram um predomínio de células B., Hudnall et al. (2005) demonstraram que em 20 tonsilas positivas para EBER, a maioria das células (82%) exibia fenótipo B (CD20 positivo), 11% não expressava antígenos de linhagem específica B ou T, considerada linhagem indeterminada com morfologia plasmocitóide, poucas eram células T (CD3 positivas) e raras eram NK ou epiteliais. Dessas 59% eram localizadas na zona IF e 27% nas criptas epiteliais ricas em linfócitos e 15% estavam no CG. A semelhança deste estudo, observamos predomínio da infecção em zona interfolicular (95,1%) porém com maior frequência de linfócitos positivos no interior do

epitélio (39%) de criptas tonsilares. Apesar de descrita na literatura a infecção do epitélio pelo EBV, no nosso estudo não identificamos células epiteliais positivas para EBER à morfologia, nem foi possível determinar o fenótipo das células infectadas, ou seja se eram linfócitos B, T ou NK.

Acredita-se que a ativação de células com mudança para o ciclo lítico no interior do epitélio favorece a liberação de vírus para meio externo e a transmissão para outros indivíduos através da saliva. Assim, o encontro de linfócitos infectados no interior do epitélio das criptas tonsilares corrobora que esta é uma possível via de contágio. Hug et al. (2010) ao estudarem tonsilas de população pediátrica com MI ou soropositividade para EBV (sem MI) observaram uma relação direta entre o tamanho da tonsila e quantidade de DNA do EBV. E, concluíram que a população que possui aumento tonsilara brigava DNA do EBV em região oral em quantidade quase similar aos pacientes com MI, maior do que aqueles que não possuíam aumento tonsilar. Infelizmente, no nosso estudo não foi possível medir o volume tonsilar ou fazer correlações entre outros dados e densidade de células infectadas em tonsilas.

Os aspectos mais distintos do nosso estudo quando comparado com outros foi a maior densidade de células infectadas e principalmente o padrão de infecção de centros germinativos. O interesse pela infecção pelo EBV de células do centro germinativo cresceu muito a partir do conhecimento que o EBV é oncogênico e que independente deste vírus, muitos dos linfomas B tem origem em células que passaram pelo centro germinativo (WHO, 2001). Nos nossos casos, além da presença de CG infectados, apenas um centro germinativo, dos vários encontrados na secção, exibia este padrão de infecção. Este tipo de achado também foi descrito em Niedobitek et al. (1992), e principalmente observado em MI e em pacientes HIV-positivos. Considerando que a expansão de centros germinativos durante a resposta imune pode gerar expansão do número de células infectadas, este padrão de infecção em GC

pode estar relacionado a maior predisposição ao desenvolvimento de linfomas B associados a esta infecção viral.

Em relação à infecção de GC observamos três diferentes padrões: a) expansão do GC por células infectadas com marcação de quase todas as células, b) células positivas na periferia (interface com o manto) e CGs com expressão eventual de células, ou seja, a expressão era de células esparsas, salientando que, um mesmo indivíduo não apresentou diferentes padrões de expressão no CG. É possível que esses padrões se correlacionem com a fase da infecção, sendo que os indivíduos que apresentam células infectadas na periferia de CG estão em estágios iniciais do estímulo antigênico e poderão progredir para uma expressão em todas as regiões do CG. Enquanto que a positividade de poucas células no CG pode representar células em trânsito ou mesmo células T auxiliaadoras. Entretanto, seriam necessários estudos sorológicos concomitantes para estabelecer a fase da infecção.

Como citado anteriormente, o CG é o local no qual células B sob estímulo antigênico sofrem expansão e seleção e se tornam células B de memória (Abbas et al., 2008). Portanto, estudar essa estrutura é fundamental para o entendimento da infecção latente pelo EBV. Roughan et al. (2009) observaram muito poucas células infectadas por EBV em CG, em média 3 a 4 por CG, com máximo de 1 a 9 células. Esta análise quantitativa foi realizada pela contagem de células que expressavam EBER1 em pacientes com menos de 18 anos, método semelhante ao realizado no presente trabalho. Distinto deste estudo nós observamos no mínimo 16 células/ campo de maior aumento em CG, significando maior densidade de células infectadas. Porém, o estudo de Roughan et al. (2009) não fez uso de microscopia para a contagem das células positivas, portanto os resultados aqui encontrados e do estudo anteriormente citado podem não ser comparáveis.

Um questionamento importante é se as crianças que exibem expansão de células em CG ocupando todo o CG têm maior chance de desenvolverem linfomas associados a infecção



pelo EBV. No nosso meio, cerca de 100% dos linfomas de Burkitt e Linfomas de Hodgkin pediátricos, abaixo de 8 anos de idade, estão associados a infecção pelo EBV (Araújo et al., 2006). Na África, a relação entre a infecção pelo EBV e linfoma de Burkitt endêmico em zonas de malária falcíparumé bem conhecida. Assim a infecção pelo EBV não parece suficiente para transformação e proliferação celular e age apenas como co-fator. Corroborando esta hipótese, pacientes imunossuprimidos, quer seja pelo uso de medicações imunossupressoras ou pela infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) exibem um risco 100x maior de desenvolver linfoma, e a maioria destes associados à infecção pelo EBV. Possivelmente as nossas crianças, infectadas muito precocemente não controlam bem esta infecção, porém não existe estudo epidemiológico acerca da frequência de linfomas pediátricos associados ao EBV no nosso meio.

Em comparação com estudo anterior de Araújo et al. (1999) em tonsilas na mesma área havia prevalência de infecção em 50% da amostra, esta prevalência sofreu discreta redução (36,9% atualmente) com menor índice de infecção em CG. A infecção pelo EBV em neoplasias tem sido relacionada a condições sócio-econômias (Rickinson & Kieff,1996). Assim, esta redução em tecidos normais pode refletir em melhoria da condição social, entretanto, é necessário citar que as lâminas foram processadas entre quinze e dezoito anos atrás o que prejudicou a análise de algumas lâminas com dificuldade de visualização preciso do sinal.

Além da limitação anteriormente citada, a ausência de uma análise do rearranjo de imunoglobulinas por PCR (reação de polimerase em cadeia) das células que expressaram EBER (*PCR de células isoladas*), principalmente, aquelas que o expressaram no CG, foi outro fator limitante. Estes estudos poderiam acrescentar informações acerca da natureza das células infectadas, determinando a clonalidade ou não dessas células.

Portanto, do que aqui foi exposto podemos concluir que cerca de 39% das tonsilas de crianças exibem infecção pelo EBV, a maioria com baixa colonização tecidual, possivelmente resultando em baixa liberação de vírus pela saliva. Distinto dos dados da literatura observamos um frequente padrão de infecção em CG que pode se correlacionar com uma maior frequência de linfomas B pediátricos associados a esta infecção. Portanto, são necessários estudos complementares no sentido de estabelecer a frequência global de linfomas na população adulta e pediátrica e a possível relação dos diferentes tipos de linfomas à infecção pelo EBV.

## VII. CONCLUSÕES

1. Em tecido não neoplásico há mais expressão de EBER em região interfolicular.
2. Das lâminas com expressão, apenas 19,5% apresentavam células positivas em CG
3. A expressão em CG apresentou três padrões: expressão em todo o CG (homogênea ou heterogênea), expressão em perifeira de CG e expressão eventual.
4. A maior parte das lâminas positivas apresentava baixa densidade de infecção 48,8%, portanto nossa população apresenta em sua maioria baixa colonização em tecido tonsilar.
5. A prevalência de infecção epitelial foi de 39%, o que se correlaciona com possibilidade de transmissão da infecção

## VIII. SUMMARY

**Introduction:** The Epstein- Barr virus (EBV) infects about 90 % of the world population, causing benign and self-limited infection, and has been associated with some subtypes of lymphomas. In our environment, pediatric Burkitt lymphomas and Hodgkin lymphomas are associated with EBV, in about 87% of cases. **Objective:** To identify morphological pattern of EBV infection in pediatric palatine tonsils, considered the gateway of infection. **Methods:** One hundred and twenty tonsils with lymphoid hyperplasia, subjected to in situ hybridization for EBER1 and 2 were evaluated regarding the localization and quantification of infected cells. After microscopy, 6 were excluded. As a positive control 3 tonsils mononucleosis -like were used. **Results:** Forty-one (36.9 %) of 111 slides were positive for EBER. The cells were located in the interfollicular region (95.1 %), intra -epithelial region (39 %) and germinal center (19.5 %). The density of infection was considered low when (less than 10 cells / field), moderate (11 to 20 cells/10 fields), high density (above 20 cells/10 fields) and hot spots (above 50 cells / field). Most cases were low and moderate infection (75% of cases). The three mononucleosis-like exhibited high density of infection, infected and transformed cells in the germinal center, intraepithelial area and interfollicular. **Conclusions:** The frequency of EBV infection in our study was similar to that published in the literature. However, the pattern of infection in germinal center is distinct. There is high frequency of EBV infection in pediatric lymphomas arising in cells of the germinal center in our midst, then this pattern may be related to the precursor cells of these lymphomas. However, to evaluate the impact of lymphoma genesis in our midst, epidemiological studies are necessary, as has been demonstrated in Africa.

**Keywords :** EBV , tonsils , in situ hybridization

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular. Ativação da Célula B e produção de anticorpos.* In: *Imunologia Celular e Molecular.* 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 243-68.
2. Al Tabaa Y, Tuailon E, Bollore K, Foulongne V, Petitjean G, Seigneurin J-M, et al. Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* 2009Jan;113(3):604–11.
3. Altmann M, Pich D, Ruiss R, Wang J, Sugden B, Hammerschmidt W. Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Sep;103(38):14188–93.
4. Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected infection cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 1995Feb; 85(3):744–50.
5. Araujo I, Bittencourt AL, Barbosa HS, Netto EM, Mendonça N, Foss H-D, et al. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. *VirchowsArch* 2006 Sep; 449(3):315–9.
6. Araujo I, Foss HD, Hummel M, Anagnostopoulos I, Barbosa HS, Bittencourt A, Stein H. Frequent expression of Epstein-Barr (EBV) infected cells in germinal centres of tonsils from an area with a high incidence of EBV-associated lymphoma. *J Pathol* 1999 Feb; 187(3):326-30.
7. Asai R, Kato A, Kato K, Kanamori-Koyama M, Sugimoto K, Sairenji T, et al. Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is a virion tegument protein that dissociates from virions in a phosphorylation-dependent process and phosphorylates the viral immediate-early protein BZLF1. *J Virol* 2006 Jun;80(11):5125–34.
8. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984Jul;310(5974):207–11.
9. Balfour HH, Holman CJ, Hokanson KM, Lelonek MM, Giesbrecht JE, White DR, et al. A Prospective Clinical Study of Epstein-Barr Virus and Host Interactions during Acute Infectious Mononucleosis. *J Infect Dis* 2005Nov;192(9):1505–12.
10. Borza C, Morgan A. Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J Virol* 2004 May;78(10):5007–14.
11. Cai X, Schäfer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, et al. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog* 2006 Mar; 2(3):e23.
12. Chaganti S, Heath EM, Bergler W, Kuo M, Buettner M, Niedobitek G, et al. Epstein-Barr virus colonization of tonsillar and peripheral blood B-cell subsets in primary infection and persistence. *Blood* 2009 Jun;113(25):6372–81.
13. Childs CC, Parham DM, Berard CW. Infectious Mononucleosis. The spectrum of morphologic changes simulating lymphoma in lymph nodes and tonsil. *Am J Surg Pathol* 1987Feb; 11(2): 122-32.
14. Cohen, JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000Aug; 343(7): 481-92.

15. Dambaugh T, Hennessy K, Chamnankit L, Kieff E. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *ProcNatlAcadSci U S A* 1984 Dec;81(23):7632–6.
16. Farina A, Feederle R, Raffa S, Santarelli R, Frati L, Angeloni A, et al. BFRF1 of Epstein-Barr Virus Is Essential for Efficient Primary Viral Envelopment and Egress. *J Virol* 2005 Mar; 79(6): 3703-12.
17. Fathallah I, Parroche P, Gruffat H, Zannetti C, Johansson H, Yue J, et al. EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol* 2010 Dec; 185(11):6439–47.
18. Feederle R, Kost M, Baumann M, Janz A, Drouet E, Hammerschmidt W, et al. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J.* 2000 Jun;19(12):3080–9.
19. Feederle R, Haar J, Bernhardt K, Linnstaedt SD, Bannert H, Lips H, et al. The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes. *J Virol* 2011 Oct; 85(19):9801–10.
20. Figueira-silva CM & Pereira FEL. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitória , State of Espírito Santo , Brazil. *RevSocBraMedTrop* 2004 Set-Oct; 37(5):409–12.
21. Forte E, Salinas RE, Chang C, Zhou T, Linnstaedt SD, Gottwein E, et al. The Epstein-Barr virus (EBV)-induced tumor suppressor microRNA MiR-34a is growth promoting in EBV-infected B cells. *J Virol* 2012 Jun;86(12):6889–98.
22. Ginsburg CM., Henle W, Henle G, Horwitz CA. Infectious mononucleosis in children. Evaluation of Epstein-Barr virus-specific serological data. *JAMA* 1977 Feb; 237(8):781-5.
23. Gruhne B, Sompallae R, Marescotti D, Kamranvar SA, Gastaldello S, Masucci MG. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *ProcNatlAcadSci U S A* 2009 Feb; 106(7):2313–8.
24. Gordadze A V, Onunwor CW, Poston D, Kremmer E, Ling PD, Peng R. EBNA2 Amino Acids 3 to 30 Are Required for Induction of LMP-1 and Immortalization Maintenance. *J Virol* 2004 Apr; 78(8): 3919-29.
25. Henson BW, Perkins EM, Cothran JE, Desai P. Self-assembly of Epstein-Barr virus capsids. *J Virol* 2009 Apr; 83(8):3877–90.
26. Hudnall SD, Ge Y, Wei L, Yang N-P, Wang H-Q, Chen T. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *ModPathol* 2005 Apr; 18(4), 519–27.
27. Humme S, Reisbach G, Feederle R, Delecluse H-J, Bousset K, Hammerschmidt W, et al. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *ProcNatlAcadSci U S A* 2003 Sep; 100(19):10989–94.
28. Hug M, Dorner M, Fröhlich FZ, Gysin C, Neuhaus D, Nadal D, et al. Pediatric Epstein-Barr virus carriers with or without tonsillar enlargement may substantially contribute to spreading of the virus. *J InfectDis* 2010 Oct; 202(8):1192–9.
29. Imai S, Nishikawa J, Takada K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* 1998 May; 72(5):4371–8.
30. Johannsen E, Luftig M, Chase MR, Weicksel S, Cahir-McFarland E, Illanes D, et al. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *ProcNatlAcadSci U S A* 2004 Nov; 101(46):16286–91.

31. Kieff, E., Johannsen, E., Calderwood, A. Latent Epstein-Barr Virus infections. "In": Robertson, E. S, editor. Epstein-Barr Virus latency and transformation. Norfolk: Caister Academic Press; 2010. p. 1-25.
32. Kieff, E., Rickinson, A. B. Epstein-Barr virus and its replication. *In* D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. M. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2603–2654.
33. Kondo S, Yoshizaki T, Wakisaka N, Horikawa T, Murono S, Jang KL, et al. MUC1 induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 causes dissociation of the cell-matrix interaction and cellular invasiveness via STAT signaling. *J Virol* 2007 Feb; 81(4):1554–62.
34. Kwok H, Tong AHY, Lin CH, Lok S, Farrell PJ, Kwong DLW, et al. Genomic sequencing and comparative analysis of Epstein-Barr virus genome isolated from primary nasopharyngeal carcinoma biopsy. *PLoSOne* 2012May;7(5):e36939.
35. Lee JM, Lee K-H, Weidner M, Osborne B A, Hayward SD. Epstein-Barrvirus EBNA2 blocks Nur77- mediatedapoptosis. *ProcNatlAcadSci U S A* 2002Sep;99(18):11878–83.
36. Liu M-T, Chang Y-T, Chen S-C, Chuang Y-C, Chen Y-R, Lin C-S, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity. *Oncogene* 2005Apr;24(16): 2635–46.
37. Liu P, Fang X, Feng Z, Guo Y-M, Peng R-J, Liu T, et al. Direct sequencing and characterization of a clinical isolate of Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma tissue by using next-generation sequencing technology. *J Virol* 2011Nov;85(21):11291–9.
38. Lu J, Murakami M, Verma SC, Cai Q, Haldar S, Kaul R, et al. Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology* 2011Feb;410(1):64–75.
39. Luzuriaga K& Sullivan JL. (2010). Infectious mononucleosis. *N EngJMed* 2010 May;362(21), 1993–2000.
40. Mancao C, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood*. 2007Nov;110(10):3715–21.
41. Niedobitek G, Agathangelou A, Steven N, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis: detection of the virus in tonsillarB lymphocytes but not in desquamated oropharyngeal epithelial cells. *Mol Pathol*Feb 2000;53(1):37–42.
42. Niedobitek G, Herbst H, Young LS, Brooks L, Masucci MG, Crocker J, et al. Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood* 1992 May;79(10):2520–6.
43. Odumade OA, Hogquist KA, Balfour HH. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *ClinMicrobiolRev* 2011 Jan;24(1):193–209.
44. Okubo M, Tsurukubo Y, Higaki T, Kawabe T, Goto M, Murase T, et al. Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *CancerGenetCytogenet* 2001Aug;129(1):30–4.
45. Okuno K, Takashima K. Epstein-Barr virus can infect rabbits by the intranasal or peroral route: An animal model for natural primary EBV infection in humans. *J MedViro* 2010 May;82:977–86.

46. Oliveira LHS, Santos LS, Nogueira FG. Epstein Barr virus detection in cervical samples of women living with human immunodeficiency virus. *RevInstMedTropSao Paulo*. 2011Jul-Aug;53(4):231–4.
47. Qiu J, Cosmopoulos K, Pegtel M, Hopmans E, Murray P, Middeldorp J, et al. A novel persistence associated EBV miRNA expression profile is disrupted in neoplasia. *PLoSPathog* 2011Aug;7(8):e1002193.
48. Rechsteiner MP, Berger C, Zauner L, Sigrist JA, Weber M, Longnecker R, et al. Latentmembraneprotein 2B regulatessusceptibilitytoinductionoflytic Epstein-Barrvirusinfection. *J Virol* 2008Feb;82(4):1739–47.
49. Rickinson, A. & E. Kieff . Epstein Barr virus. In: Fields N, Knipe D, eds. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Press Ltd; 1996:2397–2446.
50. Roughan JE, Torgbor C, Thorley-Lawson D A. Germinal center B cells latently infected with Epstein-Barr virus proliferate extensively but do not increase in number. *J Virol* 2010 Jan;84(2):1158–68.
51. Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A, et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their Epstein-Barr Virus Types 1 and 2 Differ in Their EBNA-3A , EBNA-3B , and EBNA-3C. *Genes*. 1990Sep;64(9):4084-92.
52. Seto E, Moosmann A, Grömminger S, Walz N, Grundhoff A, Hammerschmidt W. Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoSPathog* 2010Aug;6(8):e1001063.
53. Shair KHY, Bendt KM, Edwards RH, Bedford EC, Nielsen JN, Raab-Traub N. EBV latentmembraneprotein 1 activatesAkt, NFkappaB, and Stat3 in B celllymphomas. *PLoSPathog* 2007Nov;3(11):e166.
54. Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse H-J. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *ProcNatlAcadSci U S A* 2006 May;103(18):7065–70.
55. Sitki-green D, Covington M, Raab-traub N. Compartmentalization and Transmission of Multiple Epstein-Barr Virus Strains in Asymptomatic Carriers. *J Virol* 2003Feb;77(3): 1840-7.
56. Sixbey JW & Yao QY. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science*. 1992 May;255(5051):1578–80.
57. Tarbouriech N, Buisson M, Géoui T, Daenke S, Cusack S, Burmeister WP. Structural genomics of the Epstein-Barr virus. *ActaCrystallogr D BiolCrystallogr* 2006 Oct;62:1276–85.
58. Thorley-Lawson DA, Duca KA, Shapiro M. Epstein-Barr vírus: a paradigm for persistentinfection – for real andvirtual reality. *TrendsImmunol* 2008Apr; 29(4): 195-201.
59. Tsai K, Thikmyanova N, Wojcechowskyj JA, Delecluse H-J, Lieberman PM. EBV tegument protein BNRF1 disrupts DAXX-ATRX to activate viral early gene transcription. *PLoSPathog*. 2011Nov;7(11):e1002376.
60. Viral Zone. Disponível em: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/185.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/185.html). Acessado em: 30 de outubro de 2013.
61. Wang W, Chang L, Liu S. Molecular interactions of Epstein-Barr virus capsid proteins. *J Virol* 2011 Feb;85(4):1615–24.
62. Wang X, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barrviruslackingglycoprotein gp42 canbindto B cells



- butisnotabletoinfect. *J Virol* 1998a Feb;72(1):158–63.
63. Wang X, Kenyon WJ, Li Q, Müllberg J, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* 1998b Jul;72(7):5552–8.
64. Wasil LR, Tomaszewski MJ, Hoji A, Rowe DT. The effect of Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 2 expression on the kinetics of early B cell infection. *PLoS One* 2013 Jan;8(1):e54010.
65. Whitehurst, C. B., Ning, S., Bentz, G. L., Dufour, F., Gershburg, E., Shackelford, J., et al. The Epstein-Barrvirus (EBV) deubiquitinatingenzyme BPLF1 reduces EBV ribonucleotidereductaseactivity. *J Virol* 2009 May;83(9):4345–53.
66. Zeng M, Li D, Liu Q, Song L, Li M, Zhang R, et al. Genomic Sequence Analysis of Epstein-Barr Virus Strain GD1 from a Nasopharyngeal Carcinoma. *J Virol* 2005Dec; 79(24): 15323-0.
67. Zhao B, Zou J, Wang H. Epstein-Barr virus exploits intrinsic B-lymphocyte transcription programs to achieve immortal cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011Sep;108(36):14902-7.

## X. ANEXOS

### ANEXO 1 – TERMO DE DISPENSA DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TDCLE)

## TERMO DE DISPENSA DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

---

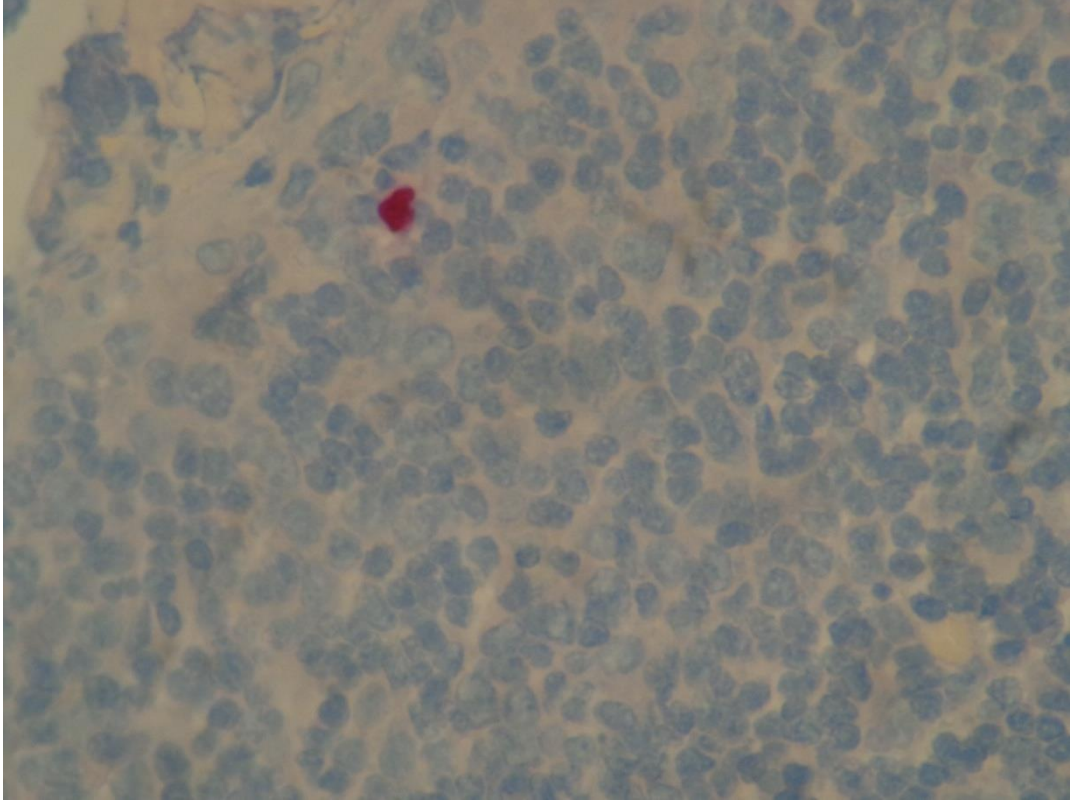
Por este termo, solicito ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia a **dispensa** do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido referente ao Projeto **INFECÇÃO PELO EBV EM TONSILAS PALATINAS** nos casos em que os pacientes não estejam mais em seguimento. A razão desta solicitação é que a população em estudo foi tonsilectomizada há mais de 8 anos, sem nenhuma solicitação por parte deste projeto, assim como não houve qualquer tratamento complementar. Assim, por tratar-se de pesquisa retrospectiva, de pacientes diagnosticados e tratados entre 1999 e 2005, espera-se que a totalidade dos pacientes esteja fora de seguimento. Assim, a justificativa para esta solicitação baseia-se nos seguintes pontos: a) os pacientes vieram ao HUPES para realizar tratamento cirúrgico sem qualquer seguimento a longo prazo, b) a maioria dos pacientes são provenientes do interior do estado da Bahia, muitas vezes locais de difícil acesso; c) pacientes que veem do interior e informam domicílio em Salvador, muitas vezes são pensões onde permanecem durante o tratamento, ou seja o contato telefônico não resultaria satisfatório em muitos casos; d) mesmo em casos que seja possível localizar o paciente por telefone, esta informação só poderá ser obtida após o manuseio do prontuário médico e pelo tempo muitos números podem ter sofrido modificações, e) a mobilização dos pacientes do interior do estado até Salvador para assinar o TCLE seria um transtorno para os pacientes, inclusive estes poderiam interpretar equivocadamente e negativamente um contato extemporâneo. Diante do exposto não há previsão para qualquer retorno destes pacientes ao HUPES, já que a patologia não gera acompanhamento contínuo. Asseguramos que todos os dados de prontuário e laudos serão codificados e os pacientes permanecerão no anonimato, em sigilo, em conformidade com o que prevê os termos da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Salvador, 31 de maio de 2013

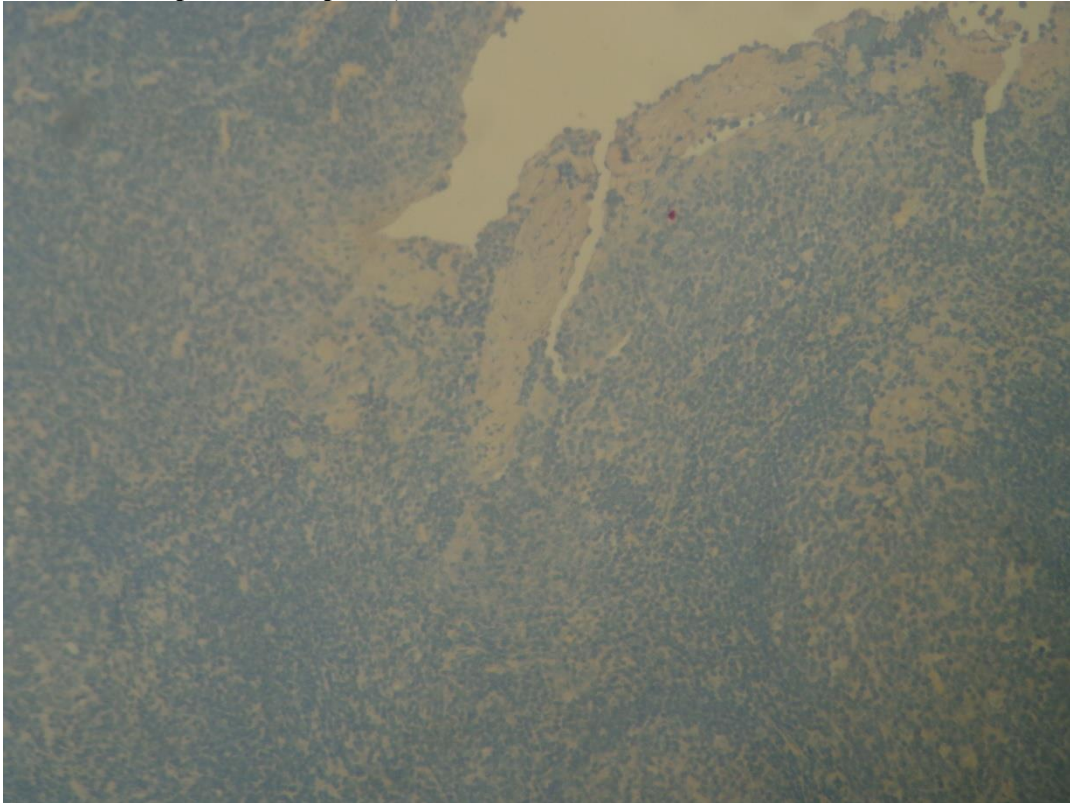
Iguaracyra Araujo – Pesquisadora responsável

ANEXO 2 - FOTOS

**Foto 1. Célula EBER positiva em epitélio, aumento de 40x. Lâmina 4613/99.**



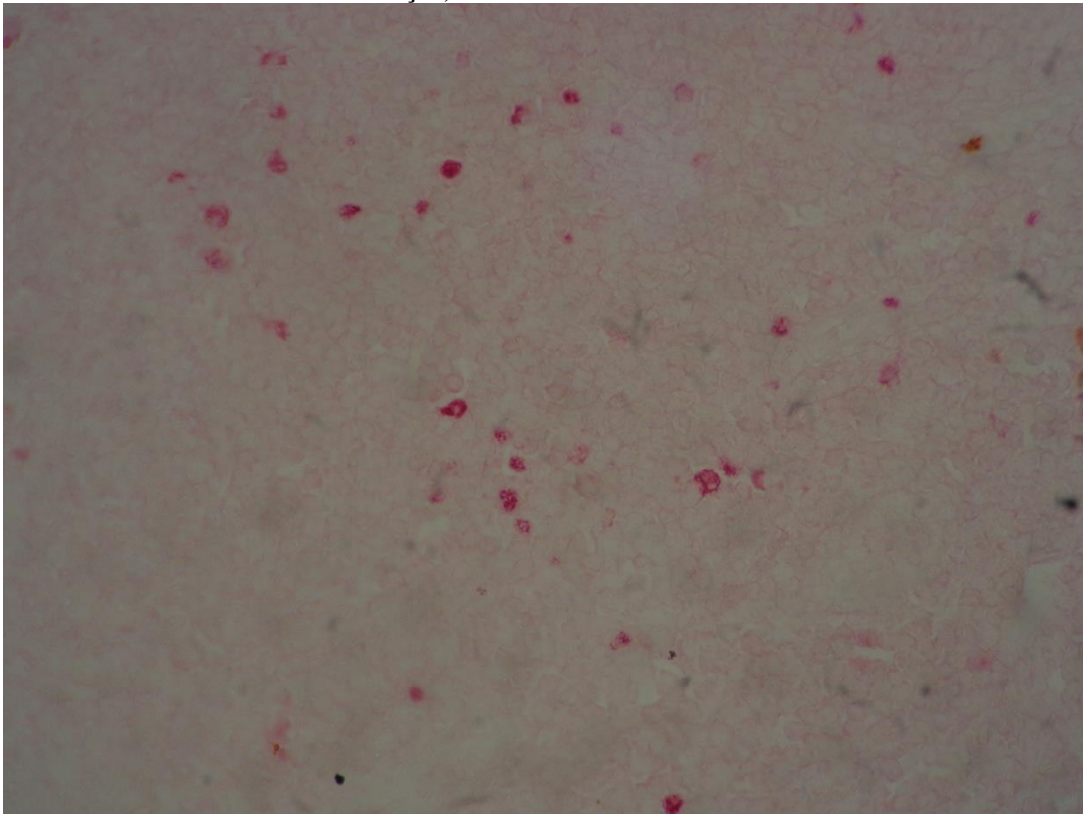
**Foto 2. Célula EBER positiva em epitélio, aumento de 4x. Lâmina 4613/99.**



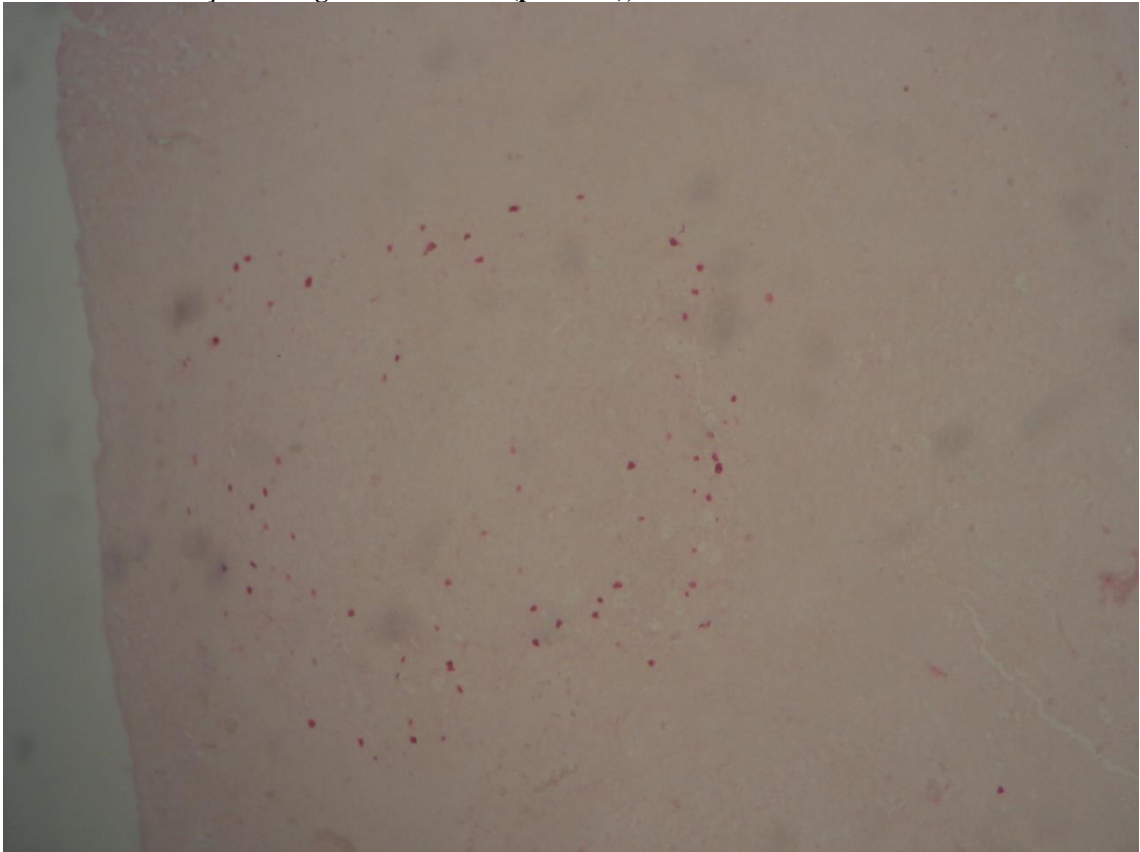
**Foto 3. Padrão de baixa densidade de infecção, aumento 4x. Lâmina MG284/98.**



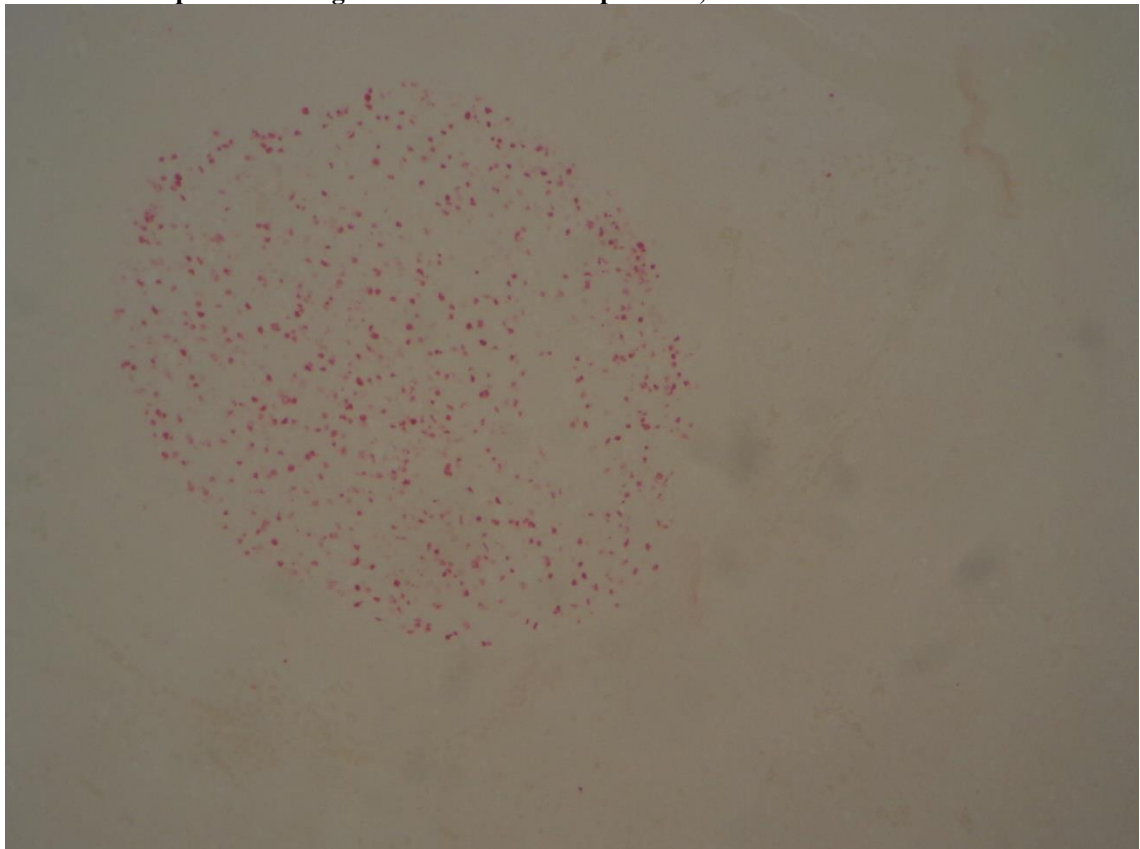
**Foto 4. Padrão de alta densidade de infecção, aumento de 40x. Lâmina H7679/96.**



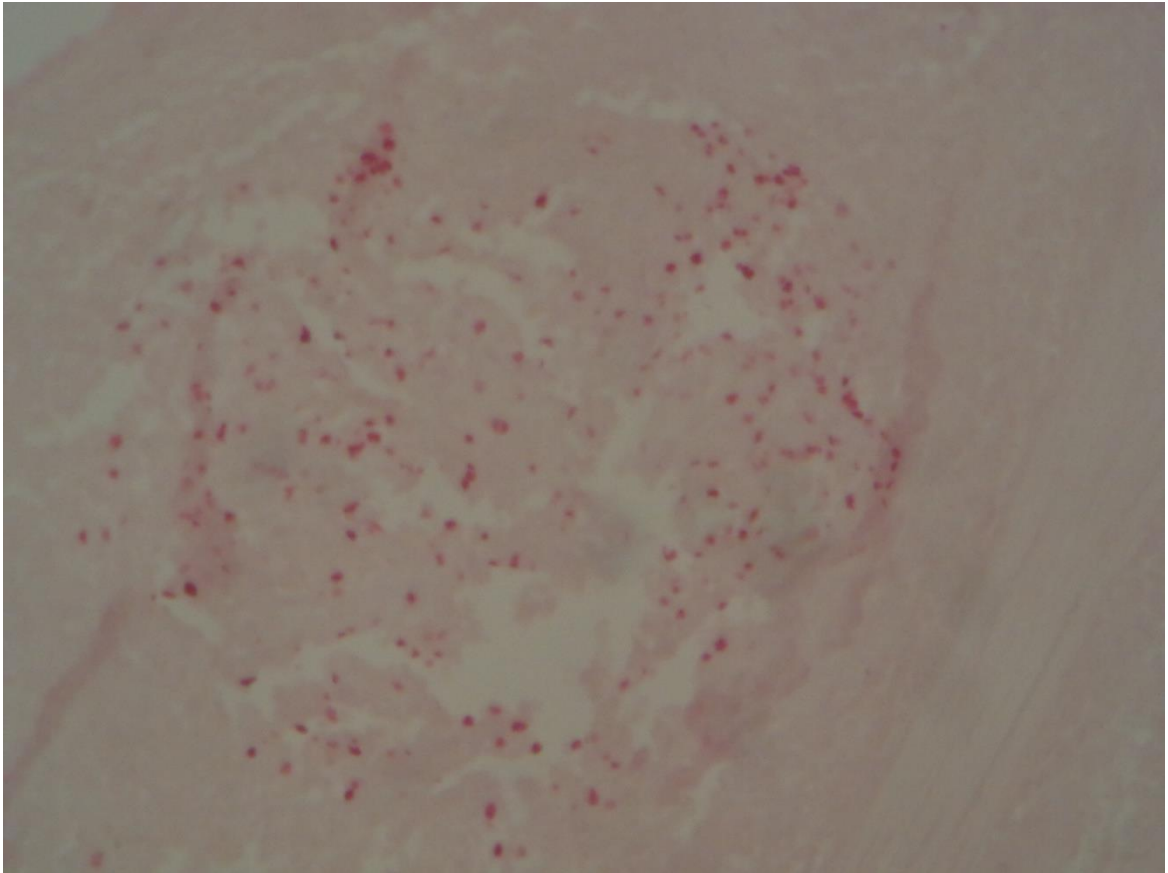
**Foto 5. CG com infecção em região de interface (periferia), aumento de 4x. Lâmina 436/99.**



**Foto 6. CG com expressão homogênea de células EBER positivas, aumento de 4x. Lâmina 5582/99.**



**Foto 7. CG com padrão heterogêneo de infecção e áreas com ausência de tecido, aumento de 4x. Lâmina MG244/99.**



## ANEXO 3 - PARACERES CEP-HUPES E CEP-FMB



**Universidade Federal da Bahia**  
**Hospital Universitário Professor Edgard Santos**

Rua: Augusto Viana s/n - Canela - CEP 40.110.060 - Salvador - Bahia  
 Tel: (071) 339-6000 Fax: (071) 339-62228

**FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Data da Aprovação: 01 de dezembro de 1999

Título do Protocolo: **Patogênese da Infecção pelo Virus de Epstein-Barre  
 Em crianças Provenientes de uma área com alta in-  
 cidência de Linfomas Associados a este Virus.**

Nome do Investigador Principal: **Profº Iguaracyra Barreto de Oliveira Araújo.**

**APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**

O Comitê de Bioética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos  
 avaliou o projeto e aprovou-o, constando em ata.

- ( x ) Protocolo de Estudo Clínico .  
 ( x ) Termo de Consentimento Informado

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa:

Profº Ajax Atta  
 Profº Álvaro Rabelo  
 Profº Antonio Alberto Lopes  
 Profº Antonio Natalino Manta Dantas  
 Profº Edileuza Gaudenzi  
 Profº George Fragoso Modesto  
 Profº José Hamilton Almeida Barros  
 Profº Josicelia Dumet Fernandes  
 Sra. Tânia Maria Gonçalves Palma - Rep. da Comunidade

*Maria Theresa de Medeiros Pacheco*  
 Prof.ª Maria Theresa de Medeiros Pacheco  
 Presidente do Comitê de Bioética em Pesquisa do HUPES





**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Infecção pelo EBV em tonsilas palatinas

**Pesquisador:** Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 09769013.3.0000.5577

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 332.048

**Data da Relatoria:** 01/07/2013

**Apresentação do Projeto:**

Projeto foi APROVADO pelo antigo CEP do HUPES que foi desativado por diversos anos e todos os documentos de pesquisa transferidos para o CEP da MCO. Porém, como o projeto já estava desativado por mais de 5 anos não há documentação no CEP-MCO. A pesquisadora refere que todo o levantamento de dados nos prontuários já foi realizado.

O vírus de Epstein-Barr (EBV) ou Herpesvírus Humano tipo 4 é responsável pela infecção de aproximadamente 95% da população. Os mecanismos patogênicos do EBV envolvem a infecção latente de linfócitos B e células epiteliais das nasofaringe e esta infecção pode estar envolvida em uma série de condições que podem ter graves complicações, até mesmo fatais. Estudos em imunossuprimidos indicam que a mortalização celular pelo EBV e consequente aumento do número de células infectadas sejam fundamentais para a transformação maligna, mas isto não está totalmente esclarecido na literatura.

**Objetivo da Pesquisa:**

PRIMÁRIO:

Agregar informações à literatura acerca dos mecanismos patológicos do EBV na transformação e imortalização celular em tecido ou células linfóides não neoplásicas.

**Endereço:** Largo do Terreiro de Jesus, s/n

**Bairro:** PELOURINHO

**CEP:** 40.026-010

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-5564

**Fax:** (71)3283-5567

**E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 332.048

**SECUNDÁRIO:**

Investigar em tonsilas de arquivo anatomopatológico a infecção pelo EBV usando hibridização molecular.

Observar a localização e morfologia das células infectadas no tecido linfoide.

Determinar o número de células infectadas; E

Estudar a expressão de LMP1 por imuno-histoquímica, nos casos positivos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS:**

Os riscos mínimos de coleta de dados já em banco de dados.

**BENEFÍCIOS:**

Não existem benefícios previstos para o paciente, porém existe um benefício coletivo relativo ao conhecimento da doença em nosso meio, número de casos e seu comportamento biológico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo retrospectivo em banco de dados já estabelecido.

**Considerações sobre os Termos de Apresentação Obrigatória:**

TCLE: dispensado

Cronograma: Adequado.

Custos: Adequados.

Retorno do benefício para o indivíduo / instituição: SIM.

**Endereço:** Largo do Terreiro de Jesus, s/n

**Bairro:** PELOURINHO

**CEP:** 40.026-010

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-5564

**Fax:** (71)3283-5567

**E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 332.048

**Recomendações:**

- RETIRAR OTCLE, NÃO HÁ NECESSIDADE DE APRESENTAÇÃO.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineado no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeira ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4).

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

- Relatórios PARCIAIS devem ser apresentados ao CEP-FM ANUALMENTE e FINAL na conclusão do projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Largo do Terreiro de Jesus, s/n

**Bairro:** PELOURINHO

**CEP:** 40.026-010

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-5564

**Fax:** (71)3283-5567

**E-mail:** cepfmb@ufba.br



FACULDADE DE MEDICINA DA  
BAHIADA UFBA



Continuação do Parecer: 332.048

SALVADOR, 11 de Julho de 2013

---

**Assinado por:**  
**Eduardo Martins Netto**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Largo do Terreiro de Jesus, s/n

**Bairro:** PELOURINHO

**CEP:** 40.026-010

**UF:** BA

**Município:** SALVADOR

**Telefone:** (71)3283-5564

**Fax:** (71)3283-5567

**E-mail:** cepfmb@ufba.br