

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS- CAMPUS BOTUCATU

"Carga viral e genotipagem do vírus de Epstein-Barr (EBV) e análise
da frequência das variantes do gene viral BNLF-1 em indivíduos
portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)"

LEILA BERTONI GIRON

Acadêmica

DRA. SUZANE RAMOS DA SILVA

Orientadora

PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Co-orientador

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências- UNESP, Botucatu, SP- como
exigência parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Ciências Biológicas-
Modalidade Médica.

Botucatu/SP

2009

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

“Carga viral e genotipagem do vírus de Epstein-Barr (EBV) e análise da frequência das variantes do gene viral BNLF-1 em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)”

LEILA BERTONI GIRON

Acadêmica

DRA. SUZANE RAMOS DA SILVA

Orientadora

PROF. DR. DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Co-orientador

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências- UNESP, Botucatu, SP- como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas- Modalidade Médica.

Botucatu/SP

2009

DEDICATÓRIA

“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Aígor e Fátima, e a minha irmã-amiga Bruna, por tudo que fizeram durante esses anos para que tudo isso fosse possível. Sei do esforço de vocês e serei eternamente grata. Agradeço pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em cada novo desafio e vibrando a cada nova conquista. Obrigada por tudo que vocês têm feito por mim em todos esses anos de vida.

À minha vózinha querida, vó Alcena, por todo amor que sempre me deu, e também por lembrar sempre de mim e preparar aquelas marmitinhas que me ajudaram muito na minha estadia em Botucatu.

Ao meu namorado, Ricardo, por todos esses anos juntos e por me apoiar e incentivar a cada nova decisão e cada nova fase e, principalmente por estar ao meu lado e lidar com a minha mudança de um jeito que ninguém faria melhor, sempre muito compreensivo. Obrigada por estar sempre ao meu lado, nos momentos bons e nos ruins, e por tudo que fez por mim até hoje.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora e amiga, Dra. Suzane Ramos da Silva, em quem eu confiei e acreditei desde o princípio, mesmo quando bem lá no começo parecia que tudo sairia errado. Agradeço por todo tempo que dedicou a mim, não só como orientadora mas também como amiga, e por ter aceitado esse novo desafio ensinado muito das coisas que sei hoje.

*"Despertar interesse e inflamar o entusiasmo é o caminho certo para ensinar facilmente e com sucesso."
--Tryon Edwards*

Ao Prof. Dr. Deílson Elgui de Oliveira, que tenho como exemplo de pesquisador e professor a ser seguido, pela oportunidade que me foi dada, e por estar sempre disposto a ajudar e ensinar.

*"O professor medíocre conta. O bom professor explica. O professor superior demonstra. O grande professor inspira."
William Arthur Ward*

AGRADECIMENTOS

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

À Deus, por tudo que conquistei até agora e por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho.

À minha família do ERBM/ENBM, principalmente Akuzada, Kuentro, Dori, Minu, Panda e Bugs. Juntos aprendemos coisas no encontro que nenhuma faculdade nos ensinaria. Aprendi muitas coisas com cada um de vocês, mas o que tenho mais orgulho de levar dessa escolinha do ERBM é a amizade que criamos, daquelas que só de olhar sabemos o que está acontecendo com o outro. Cada briga e cada conquista que tivemos valeram muito à pena, pois nos fortalecia cada vez mais. Espero do fundo do meu coração que essa família não se separe nunca!

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.”

Vinicius de Moraes

À Dona Ana e ao Sr. Octacílio, que me acolheram não só em sua casa, mas também em sua família. Agradeço pela companhia que me fizeram e por terem cuidado de mim todos esses anos. Vocês fizeram com que a minha estadia em Botucatu fosse muito mais agradável e me deixaram sentir como se estivesse com a minha família. Obrigado por tudo, vou sentir saudade!

AGRADECIMENTOS

As meninas do laboratório de Patologia Molecular, Carolina, Olívia e principalmente a Ana Paula e Ana Raquel por me ensinarem o que podiam e pelas longas conversas que tivemos e pelos conselhos que me deram. Obrigada pela paciência e por toda ajuda que me deram sempre que precisei.

Aos técnicos do Laboratório de Imuno-histoquímica, Marquinhos, Fernando, Celene e Cris. Vocês são pessoas maravilhosas e muito divertidas. Obrigada por terem me recebido tão bem e por todo o carinho que tiveram.

Aos médicos e enfermeiras do Hospital-dia de HIV/Aids da Faculdade de Medicina de Botucatu, e principalmente aos pacientes por terem aceitado participar desse estudo.

À Líciana Vaz de Arruda Silveira, por toda a análise estatística realizada.

À FAPESP (IC#2008/54927-0) pelo apoio financeiro para a realização desse estudo.

À todos que não foram aqui citados mas que sempre torceram por mim e me ajudaram de alguma forma.

*“Escolhe um trabalho de que gostes e não terás
que trabalhar nenhum dia na tua vida”*
Confúcio

Carga viral e genotipagem do vírus de Epstein-Barr (EBV) e análise da frequência das variantes do gene viral BNLF-1 em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)”

Sumário

1	Resumo	13
2	Introdução	14
2.1	Síndrome de imunodeficiência adquirida e o vírus da imunodeficiência humana	14
2.2	Vírus de Epstein-Barr - EBV	16
2.3	EBV e doenças associadas em portadores do HIV	20
3	Objetivos	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	Material e Métodos	24
4.1	Delineamento geral do trabalho	24
4.2	Extração de DNA	25
4.3	Informações clínico-epidemiológicas	26
4.4	Quantificação da Carga Viral do EBV	26
4.4.1	Quantificação do número de cópias virais	26
4.4.2	Quantificação do número de células	28
4.5	Deteção dos genótipos do EBV	29
4.6	Deteção das variantes de BNLF-1	30
5	Resultados	31
5.1	Levantamento dos dados clínico-epidemiológico	31
5.2	Quantificação da Carga Viral do EBV	31
5.3	Quantificação do número de células	35
5.4	Cálculo da carga viral do EBV	37
5.5	Genotipagem dos isolados virais do EBV	41
5.6	Deteção das Variantes de BNLF-1	44
6	Discussão	46
7	Conclusões	53
8	Referências Bibliográficas	54
9	Apêndice	54
10	Anexos	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo biológico do EBV. Adaptado de Shapiro M. e colaboradores (2007) ⁷⁴	18
FIGURA 2 - Delineamento do estudo.....	24
FIGURA 3 – Detecção de IL-10-humana em alguns casos do estudo. Marcador de peso molecular de 50pb. Seta não-tracejada indica banda do marcador de 250pb, seta tracejada indica <i>amplicon</i> esperado de 130pb para IL-10-humana.....	25
FIGURA 4 – Reação para detecção do EBV por qPCR em linhagens celulares EBV-positivas e negativas.	27
FIGURA 5 – Padronização da reação de detecção e quantificação do EBV por qPCR. A: Curva padrão em triplicatas idênticas. B: Curva padrão em triplicatas reais.	28
FIGURA 6 – Gráficos de amplificação de bgfl-5 do EBV por qPCR. As datas do experimento, parâmetros da qPCR analisados e amostras avaliadas estão listados no quadro 6.....	33
FIGURA 7 - Gráficos de amplificação de segmento do envelope de ERV-3 por qPCR. As datas do experimento, parâmetros da qPCR analisados e amostras avaliadas estão listados no quadro 7.....	36
FIGURA 8 - Avaliação da reprodutibilidade dos resultados da quantificação para EBV (à esquerda) e ERV-3 (à direita). Os gráficos demonstram as correlações obtidas entre os Cts das duas replicatas avaliadas para cada amostra do estudo.	37
FIGURA 9 - Avaliação da reprodutibilidade das associações entre os Cts do EBV e do ERV-3 (porção superior da figura) e de cópias virais por número de células (porção inferior da figura) obtidos nas réplicas 1 (à esquerda) e réplicas 2 (à direita) para cálculo da carga viral do EBV/célula.	38
FIGURA 10 – Correlações obtidas entre a média das carga virais para cada amostra do estudo entre as réplicas 1 e 2.	38
FIGURA 11 – Genotipagem baseada na amplificação de EBNA-2 do EBV. Banda de 497pb esperada para EBV-1, e 150pb esperada para EBV-2. Amostras em azul são EBV-1-positivas, amostras em verde são positivas para EBV-2 e as indicadas em vermelho são co-infectadas pelos EBVs 1 e 2. Amostras em preto não amplificaram. LCL-RJ: células de linfoma de Burkitt, co-infectadas com EBVs tipos 1 e 2, note banda de 497pb indicada em azul (cabeça de seta) e a de 150pb indicada em verde (cabeça de seta). No: Amostras sem DNA, NoN: Amostra sem DNA da <i>nested</i> -PCR. M: marcador de peso molecular de 50pb, seta indica banda de 250pb do marcador.	42
FIGURA 12 - Genotipagem baseada na amplificação de EBNA-2 do EBV. Banda de 497pb esperada para EBV-1, e 150pb esperada para EBV-2. Amostras em azul são EBV-1-positivas, amostras em verde são positivas para EBV-2 e as indicadas em laranja são co-infectadas pelos EBVs 1 e 2. Amostras em preto não amplificaram. LCL-RJ: células de linfoma de Burkitt, co-infectadas com EBVs tipos 1 e 2, note banda de 497pb indicada em azul (cabeça de seta) e a de 150pb indicada em verde (cabeça de seta). No: Amostras sem DNA, NoN: Amostra sem DNA da <i>nested</i> -PCR. M: marcador de peso molecular de 50pb, seta indica banda de 250pb do marcador. * Amostras que não amplificaram na primeira <i>nested</i> -PCR, foram repetidas utilizando 1,25µL de amplificado da primeira reação sem diluir.	43

FIGURA 13 – Detecção das variantes de BNLF-1 do EBV. A e B: Amostras indicadas em laranja apresentam a variante sem a deleção de 30pb, enquanto as indicadas em azul apresentam a deleção (banda de 130pb). Amostras em preto não amplificaram. No: Amostras sem DNA; NoN – No da reação de *nested*-PCR; M: Marcador de 50pb, seta mostra banda de 250pb do marcador; BC-2 e BC-5: linhagens celulares de linfoma de efusão primário com e sem a deleção de 30pb; indicadas as bandas de 130pb e 160pb nas cabeças de seta verde e vermelha, respectivamente. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 44

FIGURA 14 - Detecção das variantes de BNLF-1 do EBV. A, B e C: Amostras indicadas em laranja apresentam a variante sem a deleção de 30pb, enquanto as indicadas em azul apresentam a deleção (banda de 130pb). Amostras em preto não amplificaram. No: Amostras sem DNA; NoN – No da reação de *nested*-PCR; M: Marcador de 50pb, seta mostra banda de 250pb do marcador; BC-2 e BC-5: linhagens celulares de linfoma de efusão primária com e sem a deleção de 30pb; indicadas as bandas de 130pb e 160pb nas cabeças de seta verde e vermelha, respectivamente. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.* Indicam amostras que não amplificaram na reação de *nested*-PCR e posteriormente foram repetidas, utilizando 1,0µL do amplificado da primeira reação sem diluir. 45

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Sequência dos iniciadores para amplificação de segmento de 130pb da região promotora do gene que codifica a IL-10-humana, componentes da reação de PCR e perfil de ciclagem.....	25
TABELA 2 – Sequências dos iniciadores da reação para detecção das variantes de BNLF-1, reagentes constituintes da reação de PCR e perfil de ciclagem, de ambas as etapas da reação de <i>nested</i> -PCR.	30
TABELA 3 – Valores médios dos Cts obtidos nas reações de qPCR para EBV e para ERV-3.	37
TABELA 4 – Análise das medianas da carga viral obtida pela qPCR em relação às respostas à HAART.....	40
TABELA 5 – Correlação entre carga viral do EBV e carga viral do HIV, tempo estimado de infecção pelo HIV e contagem de linfócitos T CD ₄ ⁺ e CD ₈ ⁺	40
TABELA 6 – Análise dos diferentes genótipos do EBV de acordo com a classificação CDC.....	41
TABELA 7 – Relação das medianas das cargas virais do EBV com os diferentes genótipos do EBV.	43

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO 1 – Sequências dos oligonucleotídeos (iniciadores e sonda <i>Taqman</i> ®) utilizados para detecção e quantificação do EBV pela técnica de PCR em tempo real.	26
QUADRO 2 - Relação das linhagens celulares de doenças linfoproliferativas ocorrendo em pacientes portadores do HIV, cujo DNA foi utilizado na padronização da pesquisa do EBV por qPCR.	27
QUADRO 3 – Sequências dos oligonucleotídeos (iniciadores e sonda <i>Taqman</i> ®) utilizados para detecção e quantificação da carga viral do EBV pela qPCR.	29
QUADRO 4 - Sequências dos iniciadores da reação para genotipagem de EBV-1 e EBV-2, reagentes constituintes da reação de PCR e perfil de ciclagem.....	30
QUADRO 5 – Síntese dos parâmetros de qualidade das reações de qPCR empregadas para pesquisa do EBV por qPCR.	32
QUADRO 6 – Síntese dos parâmetros de qualidade das reações de qPCR empregadas para pesquisa do ERV-3.....	35
QUADRO 7 – Testes estatísticos empregados nas associações avaliadas entre informações clínico-epidemiológicas dos pacientes e os resultados obtidos com carga viral do EBV, genotipagem e variantes de BNLF-1. As casa com destaque em laranja mostram associações com significância estatística ($p < 0,05$).	39

1 Resumo

Indivíduos imunocomprometidos possuem maior risco de desenvolver linfomas associados ao EBV. A detecção desse vírus em sangue periférico e a determinação de sua carga viral podem ter importância na evolução clínica de indivíduos portadores do HIV. Foram avaliadas 156 amostras de pacientes HIV-positivos pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção e quantificação da carga viral do EBV. 123/156 (78,8%) casos apresentaram carga viral detectável para o EBV, sendo que a carga viral média foi de $6,9 \times 10^{-3}$ cópias de EBV/célula. Foi detectada elevada carga viral do EBV em indivíduos com falha terapêutica ou sem HAART ($p = 0,0076$), em coinfectados pelos EBVs 1 e 2 ($p = 0,0205$), em pacientes com altas cargas de HIV ($\rho = 0,27614$, $p = 0,0005$) e longos períodos de infecção pelo HIV ($\rho = 0,24164$, $p = 0,0026$) e os que apresentavam altos níveis de linfócitos T CD_8^+ ($\rho = 0,19286$, $p = 0,0159$). A amplificação do gene EBNA-2 para realização da tipagem viral foi possível em 95/123 (77,2%) amostras, das quais 72 (75,8%) revelaram infecção pelo EBV-1, 9 (9,5%) pelo EBV-2 e 14 (14,7%) apresentavam coinfecção entre os EBVs 1 e 2. Esses dados estão de acordo com a literatura visto que o tipo 1 é predominante em países ocidentais e 70,0% da coorte era composta por indivíduos caucasianos e heterossexuais. A maioria dos pacientes que apresentaram coinfecção pelos EBVs 1 e 2 tiveram contagem de linfócitos T CD_4^+ entre 200 e 499 células/ μ L de sangue segundo classificação CDC ($p = 0,0272$). Quanto a análise do gene BNLF-1, a amplificação foi possível em 99/123 (80,5%). Desses 50/99 (50,5%) apresentavam a deleção de 30pb no gene, enquanto 49/99 (49,5%) não a possuíam. Em conjunto, os resultados obtidos evidenciam deterioração do sistema imunitário, caracterizada pela diminuição da capacidade do sistema imunológico em conter a disseminação do EBV, levando ao aumento na carga viral, resultado da reativação do EBV e do aumento no número de células latentemente infectadas.

2 Introdução

2.1 Síndrome de imunodeficiência adquirida e o vírus da imunodeficiência humana

Descrita no início da década de 1980, a síndrome de imunodeficiência adquirida (*Acquired Immune Deficiency Syndrome* - Aids) é caracterizada por redução progressiva de linfócitos T CD₄⁺ e aumento significativo da susceptibilidade a doenças infecciosas, algumas raramente encontradas em humanos²⁹. Em 1981, cinco casos de uma pneumonia rara em indivíduos imunocompetentes, ocasionada pelo *Pneumocystis jiroveci*, foram relatados pelos Centros de Controle de Doenças (*Centers for Disease Control* – CDC) dos Estados Unidos¹¹. Entre 1983 e 1984, dois grupos independentes, liderados pelos pesquisadores Robert Gallo e Luc Montaigner, isolaram e identificaram o retrovírus causador da aids, que foi denominado vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV)⁴⁸. O mais antigo caso de infecção pelo HIV foi documentado a partir de uma amostra de soro coletada em 1959, proveniente de Kinshasa, na República Democrática do Congo⁹⁹.

Segundo dados do Programa de Cooperação das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (*The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS* - UNAIDS), o número de indivíduos portadores do HIV aumentou significativamente desde a descoberta do vírus. Até dezembro de 2007, 33,2 milhões de pessoas eram portadoras do HIV-1 em todo o mundo; destas, 2,5 milhões eram recém-infectadas⁸⁷. Cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram em consequência direta ou indireta da aids em 2007⁸⁷. Embora aproximadamente 710 mil pessoas (adultos maiores de 15 anos) sejam portadoras do HIV no Brasil⁸⁷, a prevalência de infecção entre adultos no país tem se mantido estável nos últimos anos (aproximadamente 0,6% da população), o que reflete o resultado de políticas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença, implantadas pelo governo federal a partir de 1996⁵⁸.

A história natural de infecção pelo HIV pode ser dividida em três estágios: 1) Primária ou aguda, 2) Crônica ou assintomática e 3) Doença avançada ou Aids. Usualmente durante a infecção primária sintomas não-específicos de infecção viral aparecem em 50-70% dos indivíduos após 2 semanas de infecção pelo HIV (com pico virêmico de 10⁶-10⁷ cópias/mL de plasma) e desaparecem em 4 semanas na maioria dos pacientes. Por outro lado, a infecção crônica é caracterizada por um

longo período assintomático, embora haja aumento na carga viral do HIV (produção de 10^{10} partículas virais/dia) e diminuição gradativa dos níveis de linfócitos T CD_4^+ (30 a 60 células/mm³/ano). Durante a Aids ocorre decréscimo acentuado na contagem de linfócito T CD_4^+ (<200 células/mm³) e elevação na carga viral do HIV. A presença de infecções oportunistas e o surgimento de doenças neurológicas e/ou neoplasias malignas são outros indicadores de aids^{54,77}. Usualmente, a progressão para a aids ocorre entre 7 a 10 anos pós-infecção pelo HIV.

Para controle da infecção retroviral, na década de 1990 foi introduzida a terapia antirretroviral combinada de alta potência (*Highly active antiretroviral therapy* - HAART), em substituição à monoterapia com a azidotimidina (AZT)^{38,46}. A HAART é composta por múltiplas drogas com efeito na biologia do HIV, incluindo inibidores da protease retroviral e da transcriptase reversa. Pacientes portadores do HIV tratados com HAART apresentam diminuição na morbidade e mortalidade, em parte atribuídos às melhorias na resposta imunitária^{4,63}.

O HIV é um retrovírus da subfamília *Lentivirinae* e dois tipos principais são descritos até o momento: o HIV-1, principal responsável pelas infecções que culminam na aids, e o HIV-2, que causa doença mais branda⁶⁶. O genoma do HIV-1 é composto por duas fitas de RNA com 9.749 nucleotídeos, nas quais são encontrados os genes retrovirais básicos *gag*, *pol*, *env*. *Gag* codifica proteínas estruturais e proteínas da matriz; *env* codifica glicoproteínas que se inserem no envelope retroviral e interagem com receptores na superfície da célula-alvo, e *pol* codifica a transcriptase reversa, a integrase e a protease, enzimas fundamentais para a replicação do HIV⁹⁰. Proteínas regulatórias também são codificadas no genoma do HIV-1, como o regulador de expressão de vírion (*Regulator of Expression of the Virion* – *rev*), o transativador de transcrição (*Transactivator of Transcription* - *tat*) e quatro proteínas acessórias: o fator negativo (*Negative Factor* – *nef*), a proteína viral R (*Viral Protein R* - *vpr*), a proteína viral U (*Viral Protein U* - *vpu*) e o fator de infectividade viral (*Virus Infectivity Factor* – *vif*)¹⁵.

Os principais alvos do HIV são subpopulações de linfócitos T e células de linhagem macrófágica. Essas células possuem atividades fundamentais para o adequado funcionamento do sistema imunitário. O HIV infecta principalmente linfócitos T CD_4^+ devido à alta afinidade de uma glicoproteína do envelope viral, a gp120, pela molécula CD_4 expressa na superfície dessas células, utilizando-a como receptor primário^{78,90}. Todavia, a ligação gp120- CD_4 não é suficiente para promover

a entrada do retrovírus na célula, sendo necessários co-receptores, como os CXCR4 e CCR5 que são moléculas da classe dos receptores para quimiocinas^{24,78}. Após a ligação das glicoproteínas do envelope retroviral com receptores e co-receptores da superfície celular, há a fusão da membrana celular com o envelope viral e a introdução do nucleocapsídeo do HIV no citoplasma da célula. Pela ação da transcriptase reversa, o RNA retroviral liberado é convertido em DNA pró-viral, que é transportado para o núcleo e se integra no DNA genômico celular⁴⁷. A transcrição ocorre após a integração, que possibilita a síntese das proteínas retrovirais, maturação, modificação e montagem dos vírions. A liberação de novas partículas retrovirais por linfócitos ocorre, principalmente, através dos lipídeos da membrana celular⁴⁷.

A afinidade do HIV por linfócitos T CD₄⁺ e os efeitos citopáticos que a infecção retroviral exerce contribuem para a progressiva deterioração do sistema imunitário do hospedeiro, tornando-o mais suscetível às infecções por outros micro-organismos²⁸. Por outro lado, o prejuízo da vigilância imunológica no portador do HIV eleva significativamente o risco de desenvolvimento de determinadas neoplasias malignas, notadamente linfomas em cuja patogenia podem participar vírus oncogênicos, como o vírus de Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus* - EBV)^{25,28,93}.

2.2 Vírus de Epstein-Barr - EBV

O EBV, também denominado herpesvírus humano tipo 4 (*Human Herpesvirus* 4 - HHV-4), foi originalmente identificado pelo grupo de Anthony Epstein em cultura de células cultivadas a partir de uma biópsia de linfoma de Burkitt (*Burkitt Lymphoma* – BL)⁹². Posteriormente o vírus foi classificado como membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*. O genoma viral é constituído por DNA dupla fita com aproximadamente 180Kpb, mantido na forma episomal nas células infectadas. O EBV infecta preferencialmente linfócitos B e sua entrada nestas células depende da ligação da glicoproteína de superfície viral gp350/220 à molécula CD21 expressa na membrana de linfócitos B, além da ligação da gp42 à molécula de classe II do MHC⁹⁷.

Dois tipos principais de EBV são descritos: EBV-1 (ou EBV-A) e EBV-2 (EBV-B). O EBV-1 predomina em países ocidentais, enquanto ambos, EBV-1 e EBV-2, podem ser encontrados em países da África Equatorial e Nova Guiné⁸². As principais variações nos genomas virais são encontradas nas regiões que codificam os denominados antígenos nucleares do EBV (*EBV Nuclear Antigen* – EBNA).

Assim, grande parte dos estudos de genotipagem viral analisa as regiões dos EBNAs^{35,44,49,70}.

Fatores geográficos e étnicos podem influenciar a distribuição dos genótipos 1 e 2 do EBV em populações humanas, modificando a frequência de detecção desses genótipos virais nas doenças associadas ao EBV⁹⁶. Em estudo com 16 casos de linfoma de Hodgkin (*Hodgkin Lymphoma* – HL), Lin e colaboradores (1993) relataram presença do subtipo 1 do EBV em 9/16 (56%) casos da doença e infecção concomitante pelos subtipos 1 e 2 em 5/16 (31%) casos. O predomínio do EBV-1 (18/21, 85,7%) também foi relatado em casos de BL pediátrico do Brasil⁴⁴. Por outro lado, van Baarle e colaboradores (2000) relataram predominância do genótipo 2 do EBV entre homens homossexuais infectados pelo HIV-1, quando comparados com indivíduos homossexuais sem a infecção por esse retrovírus. Houve também maior frequência do subtipo 2 entre homens homossexuais quando comparados a heterossexuais, ambos não-portadores do HIV⁸⁸. Em conjunto, esses dados sugerem possíveis diferenças no contágio pelos subtipos 1 e 2 do EBV. Saliente-se que indivíduos imunocompetentes usualmente apresentam infecção por apenas um genótipo viral, enquanto ambos os genótipos podem coexistir em pacientes imunocomprometidos⁸⁹.

O EBV é transmitido pela saliva e infecta mais de 90% da população adulta em todo o mundo⁸⁴. Quando ocorre durante a infância, a infecção primária tende a ser assintomática⁴⁰, entretanto, em adolescentes ou adultos jovens pode se expressar clinicamente na forma de mononucleose infecciosa^{67,85}. A infecção primária tem início no epitélio da orofaringe, onde o vírus infecta linfócitos B intra-epiteliais (células de memória e células *naive*), ou adjacentes à mucosa epitelial (predominantemente células *naive*)⁸⁴. Células B *naive* são ativadas após a infecção pelo EBV, mesmo na ausência de estímulo antigênico externo. Como resultado há o bloqueio da diferenciação dessas células e estímulo à sua proliferação^{85,97}. Algumas das células infectadas pelo EBV são eliminadas pela ação citotóxica de linfócitos T; outras, entretanto, conseguem se evadir da resposta imunológica⁹⁷. A Figura 1 ilustra o ciclo biológico do EBV em seus hospedeiros.

Linfócitos B infectados migram para o centro germinativo e sofrem diferenciação em células de memória, principal reservatório biológico do EBV^{84,97}. Ao migrarem para o sangue periférico a expressão de proteínas do EBV é virtualmente suspensa, mimetizando a situação de um linfócito B não-infectado⁸³. Quando ocorre

divisão destas células infectadas há expressão apenas de proteínas que permitem a replicação do DNA viral^{85,97}. Ao receberem estímulo para diferenciação em plasmócitos, linfócitos B de memória infectados dão ensejo à reativação do EBV, com expressão de genes do ciclo lítico. A cascata de sinalização gerada pela ativação do receptor de célula B (*B-cell Receptor* - BCR) leva a expressão de genes imediatamente-precoces do EBV, BZLF1 e BRLF1. Estes ativam genes precoces, que consequentemente ativam genes tardios do ciclo lítico¹. Plasmócitos infectados migram para a mucosa epitelial, onde liberam novas partículas virais, que podem infectar outras células B ou serem liberadas na saliva^{83,97}.

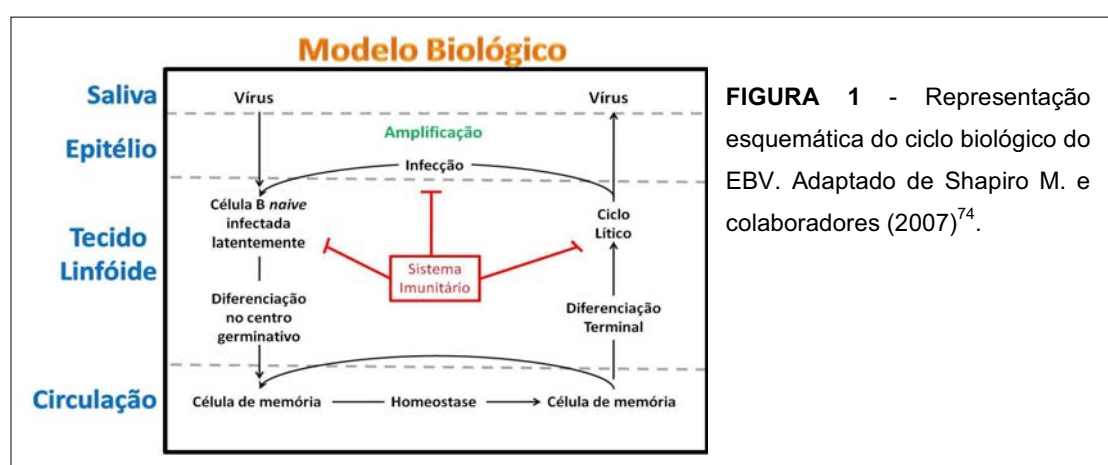


FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo biológico do EBV. Adaptado de Shapiro M. e colaboradores (2007)⁷⁴.

Programas distintos de latência biológica do EBV são definidos com base na expressão de diferentes genes virais. São descritos essencialmente três programas de latência, denominados I, II e III. Quando ocorre a entrada do vírus na célula são expressas nove proteínas latentes virais: três proteínas latente de membrana (*Latent Membrana Protein* - LMP-1, LMP-2a, LMP-2b), seis antígenos nucleares (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3a/EBNA-3, EBNA-3b/EBNA-4, EBNA-3c/EBNA-6 e EBNA-LP (*leader protein*) / EBNA-5) e dois RNAs não-poliadenilados não-codificantes (*EBV-encoded small non-polyadenylated RNAs* – EBERs/ EBER-1 e EBER-2). Esse perfil de expressão caracteriza a latência tipo III ou programa de crescimento, pois as células recém-infectadas recebem estímulos para proliferação.

Após migração das células infectadas para o centro germinativo ocorre mudança na expressão dos produtos virais, com a expressão de EBER, EBNA-1 LMP-1 e LMP-2a, o que caracteriza o programa de latência II. No centro germinativo as células B *naive* infectadas se diferenciam em linfócitos B de memória, que migram para a circulação sanguínea. Nesse estágio há expressão apenas de EBNA-

1 e EBER, ou seja, o programa de latência I ou latência verdadeira⁸³. Como os EBERs são abundantemente expressos em todos os programas de latência, sua pesquisa pela técnica de hibridação *in situ* é sistematicamente empregada para determinação da infecção pelo EBV em diferentes tecidos^{16,17}. Embora seja relatado que os EBERs possam ter propriedades oncogênicas, esses transcritos não são essenciais para transformação de linfócitos B⁸⁰.

Por outro lado, está bem definida a participação de outro produto viral, a LMP-1 (produto do gene BNLF-1 do EBV), na transformação celular. A LMP-1 é uma proteína transmembrana que fornece sinalização constante para sobrevivência e proliferação das células B infectadas pelo EBV, mimetizando a atividade de um receptor CD40 constitutivamente ativo. Essa sinalização causa ativação e diferenciação de células B e contribui para replicação do epissoma viral⁸⁶. Estudo de Gruhne e colaboradores (2009) reforçou papel oncogênico da LMP-1 ao demonstrar inibição do ponto de checagem em G2 pela LMP-1³². Outra importante função da LMP-1 é a capacidade de hiper-regular proteínas anti-apoptóticas²¹. As proteínas LMP-2A/TP1 e LMP-2B/TP2, por sua vez, inibem a sinalização do BCR, promovendo entrada do EBV no ciclo latente⁶⁷.

É relatada uma variação de BNLF-1 caracterizada pela deleção de 30pb na sequência de nucleotídeos desse gene viral, que corresponde a 10aa na porção C-terminal da proteína LMP-1. Essa variação foi inicialmente descrita em casos de carcinoma de nasofaringe na população chinesa e posteriormente documentado em outras populações infectadas pelo EBV^{3,36,71}. Rothenberger e colaboradores (1997) sugeriram que a variante deletada da LMP-1 possui maior potencial oncogênico em relação a LMP-1 completa, pois é capaz de ativar NF- κ B e AP-1 de modo mais eficiente⁶⁸. Por outro lado, não foi observada correlação entre a capacidade de ativar diferentes fatores de transcrição e a habilidade de promover transformação celular^{26, 27}. Adicionalmente, há relatos de que a deleção de 10aa C-terminal de LMP-1 não é a principal responsável pelas diferenças funcionais observadas entre as proteínas com deleção e sem deleção em LMP-1³⁹.

Outras proteínas do EBV com destacada importância são as EBNAs, que participam na replicação e manutenção do DNA viral. A proteína EBNA-1 inibe a resposta T citotóxica pela inibição de sua degradação proteossomal e retardo de sua própria síntese^{72,75}. Recentes estudos sugerem ação oncogênica de EBNA-1, pois esta é capaz de promover a hiper-regulação da unidade catalítica (Nox₂) da NADPH-

oxidase, elevando a produção de espécies reativas de oxigênio, gerando instabilidade genômica devido às quebras da fita dupla de DNA^{31,32,73}.

A EBNA-2 atua como co-ativador transcricional de genes expressos durante o programa de latência III e é essencial para a immortalização de células linfóides infectadas pelo EBV²³. Digno de nota, a repetição de prolina na porção N-terminal da proteína permite a distinção entre os subtipos 1 e 2 do EBV⁹⁶. Os EBNA-3, por outro lado, atuam na regulação transcricional de genes virais e celulares⁶⁷. EBNA-3a e 3c são essenciais para a transformação e immortalização celular, e este último também é capaz de induzir a produção de LMP-1.

Estudo de Gruhne e colaboradores (2009) demonstraram maior frequência de aneuploidia em células que expressavam EBNA-3c devido a interrupção no ponto de checagem do fuso mitótico durante a divisão celular, como resultado da diminuição dos níveis proteicos e hipo-regulação transcricional de bubR1³², BubR1 é uma das proteínas que medeiam o ponto de checagem do fuso mitótico juntamente com cenp-F, Bub1, Bub3 e Mad2, que são recrutadas pelo cinetócoro e estabilizam o complexo cinetócoro-microtúbulo^{51,56}. Em conjunto com EBNA-2, o EBNA-LP é expresso precocemente²³ e inativa os genes supressores tumorais *TP53* e *RB1*⁹⁶, promovendo a proliferação das células infectadas pelo EBV^{23,82,96}.

Alguns produtos do EBV apresentam funções equivalentes às de proteínas humanas. A proteína bcrf-1, por exemplo, apresenta 84% de homologia estrutural com a interleucina-10 (IL-10) humana, importante citocina imunossupressora da resposta imunitária celular⁸². A proteína barf-1 possui função similar ao do receptor de fator estimulador de colônias. Com relação a apoptose, esta pode ser inibida pela proteína bhfr1, enquanto outra proteína viral, a balf-1 pode inibir a função de bhfr1^{5,53,82}.

2.3 EBV e doenças associadas em portadores do HIV

Em indivíduos infectados pelo HIV, o aparecimento de linfomas pode ter a participação do EBV e de outro herpesvírus linfotrópico, o vírus associado ao sarcoma de Kaposi / Herpesvírus Humano tipo-8 (*Kaposi's sarcoma associated-herpesvirus* - KSHV/*Human Herpesvirus type 8* - HHV-8)⁹³. Nesses pacientes, a infecção pelo EBV é identificada em parcela dos casos de HL e alguns linfomas não-Hodgkin (*Non-Hodgkin Lymphoma* – NHL), como o BL, o linfoma difuso de grandes células B (*Diffuse Large B-cell Lymphoma* - DLBCL), o linfoma plasmablastico da cavidade oral e o linfoma polimórfico de células B^{7,30}. O DLBCL pode ser dividido

nas formas centroblástica e plasmablástica. A primeira ocorre em indivíduos com imunossupressão leve, possui baixa associação com o EBV e não apresenta expressão de LMP-1; a segunda ocorre em pacientes com imunossupressão severa e está frequentemente associada ao EBV, com expressão das proteínas virais LMP-1 e EBNA-2³⁰. Por outro lado, a infecção pelo KSHV/HHV-8 está associada ao desenvolvimento do linfoma de efusão primário (*Primary Effusion Lymphoma - PEL*)¹², sendo que em parcela dos casos também se verifica infecção concomitante pelo EBV.

O risco relativo para o desenvolvimento de NHL e HL em portadores do HIV é de 60-200 e 9-10 vezes maior que o da população em geral, respectivamente³⁰. O grau de imunocomprometimento parece estar relacionado com o tipo de NHL que os pacientes portadores do HIV desenvolvem, pois indivíduos com contagem de células T CD₄⁺ normal ou levemente diminuída apresentam maior risco para o desenvolvimento de BL e DLBCL centroblástico, enquanto o risco para PEL e DLBCL plasmablástico maior entre indivíduos com imunodeficiência mais severa³⁰.

Após a HAART foi observada uma redefinição da incidência de algumas neoplasias malignas associadas à aids. Houve diminuição na incidência de casos de sarcoma de Kaposi^{33,46}, e de alguns tipos de NHL^{65,76,91}. Os casos de linfoma primário do sistema nervoso central diminuíram drasticamente⁶, enquanto a incidência de BL permaneceu constante³⁸ ou com um aumento discreto¹⁹. Por outro lado, não houve variações significativas na incidência do HL e do carcinoma de colo uterino³⁸.

O BL destaca-se dentre os NHL associados ao EBV comumente observado em portadores do HIV. Trata-se de neoplasia maligna de células com imunofenótipo B que apresentam altos índices de proliferação celular e alterações citogenéticas recorrentes, notadamente t(8,14), t(2,8) ou t(8,22), que envolvem o gene *MYC*, causando sua hiperexpressão^{41,45}. O BL pode ser classificado em três formas clínico-epidemiológicas: endêmico, que acomete principalmente indivíduos da África equatorial; esporádico, que afeta crianças e adultos em todo o mundo, e associado à imunodeficiência, acometendo especificamente indivíduos portadores do HIV, pois usualmente não é encontrado em outros tipos de imunossupressão³⁰. O EBV é detectado em praticamente todos os casos de BL endêmicos e em até 50% dos casos associados ao HIV-1⁴⁵. Nos casos de BL, o repertório de genes do EBV

expressos limita-se aos EBERs e EBNA-1, característico do programa de latência tipo I¹⁴.

O EBV está também associado ao HL e o risco de desenvolvimento da doença está aumentado em quadro vezes nos indivíduos com manifestação prévia de mononucleose infecciosa^{85,92}. O HL é caracterizado pela presença das células neoplásicas de Hodgkin ou de Reed-Sternberg (H-RS)¹⁴, e pela expressão das proteínas virais EBNA-1, LMP-1, LMP- 2A e EBERs^{23,45,82,92}. São quatro as formas histológicas descritas para o HL clássico: esclerose nodular, celularidade mista, depleção linfocítica e rico em linfócitos. O EBV é mais comumente encontrado nas células H-RS dos casos de celularidade mista⁴¹. A proteína LMP-2a interfere na maturação de linfócitos B, induzindo células BCR-negativas a deixarem a medula óssea e colonizarem órgãos linfoides periféricos. De maneira semelhante às células de H-RS, as células que expressam LMP-2a aumentam a expressão de genes associados ao progresso do ciclo celular e inibição da apoptose. Estas correlações sugerem que células B EBV-positivas induzem e mantêm um estado proliferativo que poderia resultar no desenvolvimento do HL^{9,64}.

Tendo em vista que indivíduos imunocomprometidos possuem risco aumentado para o desenvolvimento de linfomas associados ao EBV, a detecção desse vírus em sangue periférico e a determinação de sua carga viral pode ter importância na evolução clínica de indivíduos portadores do HIV. Por outro lado, em virtude da maior homogeneidade nos protocolos de tratamento antirretroviral oferecidos aos portadores do HIV no Brasil, estudos nessa população são promissores para elucidação dos fatores que modificam o curso da infecção retroviral nesses pacientes, incluindo a susceptibilidade de desenvolverem doenças associadas a vírus oncogênicos, como o EBV, ou outros eventos adversos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Verificar a hipótese de que pacientes portadores do HIV apresentam alterações na evolução clínica de acordo com carga viral do EBV em sangue periférico, que pode inclusive ter associação com dados clínico-epidemiológicos, laboratoriais e de resposta ao tratamento antirretroviral.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de detecção pelo EBV nas amostras de sangue periférico de indivíduos portadores do HIV-1 atendidos no Hospital-Dia de HIV/Aids da FMB, UNESP/Botucatu.
 - Nos casos em que houver EBV detectável, quantificar a carga viral por PCR em tempo real (qPCR), distinguir os casos com infecção pelos genótipos 1 e 2, e estimar a frequência das variantes do gene BNLF-1 do EBV.
 - Correlacionar os dados analisados com as informações clínico-epidemiológicas obtidas dos prontuários-médico dos pacientes recrutados para o estudo, incluindo carga viral do HIV, contagem de linfócitos T CD_4^+ e CD_8^+ , dados de tratamento antirretroviral utilizado e resposta ao tratamento.
-

4 Material e Métodos

4.1 Delineamento geral do trabalho

Foram avaliados 156 pacientes portadores do HIV atendidos no Hospital-dia de HIV/Aids da FMB (Ofício CEP-FMB-UNESP 374/08, de 01/09/2008 – Anexo A e B). Como critérios de inclusão no estudo foram estipulados 1) pacientes com idade superior a 18 anos; 2) ausência de neoplasia relacionada ao KSHV/HHV-8 e ao EBV (notadamente SK e linfomas não-Hodgkin), na ocasião de entrada no estudo; 3) no caso de pacientes do sexo feminino, ausência de gestação ou pacientes fora do puerpério; e 4) pacientes tratados exclusivamente pelo protocolo vigente com as drogas antirretrovirais fornecidas pelo governo federal. O delineamento da pesquisa está representado na Figura 2.

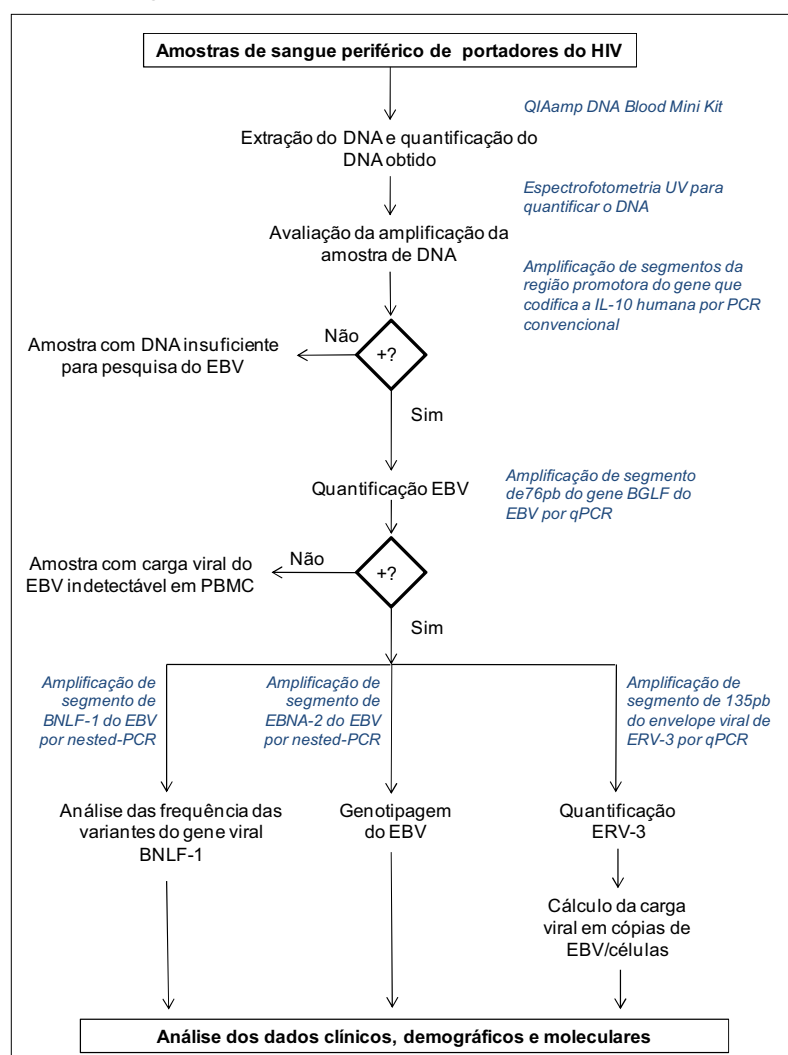


FIGURA 2 - Delineamento do estudo.

4.2 Extração de DNA

Estudo recente demonstrou que a detecção de EBV em células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cell* - PBMC) e em alíquotas de sangue total são compatíveis, apresentando correlação próxima em termos de resultados quantitativos. Entretanto, é referido que o uso de PBMC oferece maior sensibilidade³⁴. Assim, a pesquisa do EBV foi realizada a partir de DNA genômico extraído de 200µL da camada leucocitária com o sistema *QIAamp DNA Blood Mini Kit*® (Qiagen, Valencia, CA, USA), conforme instruções do fabricante. Além da quantificação por espectrofotometria UV, o DNA obtido foi avaliado quanto à capacidade de amplificar segmentos da região promotora do gene que codifica a IL-10 humana por PCR convencional. Desse modo buscou-se identificar eventuais casos falso-negativos no que se refere à presença do genoma viral nas amostras de DNA avaliadas. Na Tabela 1 está indicada a sequência dos iniciadores para detecção do *amplicon* de 130pb do gene da IL-10 humana, bem como os componentes da reação e o perfil de ciclagem. A Figura 3 ilustra o resultado de amplificação do segmento analisado do gene da IL-10 para alguns casos do estudo.

TABELA 1 – Sequência dos iniciadores para amplificação de segmento de 130pb da região promotora do gene que codifica a IL-10-humana, componentes da reação de PCR e perfil de ciclagem.

Sequências 5'- 3'	Reagentes	Perfil de Ciclagem
Mok2A ⁵⁵ -GTGGAAGAAGTTGAAATAAC	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4 / KCl 70mM), 3,0mM MgCl ₂ , 0,2 mM cada dNTP, 1,25U DNA polimerase (Taq) e 0,5 µM de cada iniciador.	94°C – 5'; 94°C – 30", 55°C – 30" , 72°C – 1' (40x); 72°C – 7'
Mok2S ⁵⁵ - ATCCAAGACAACACTACTAA		

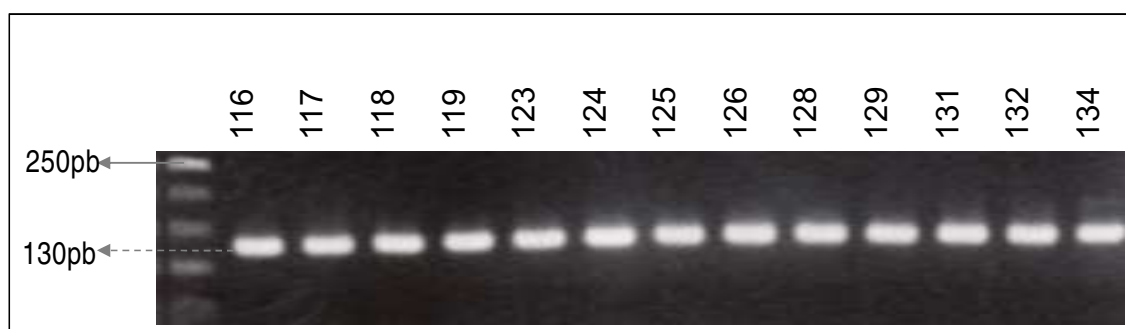


FIGURA 3 – Detecção de IL-10-humana em alguns casos do estudo. Marcador de peso molecular de 50pb. Seta não-tracejada indica banda do marcador de 250pb, seta tracejada indica *amplicon* esperado de 130pb para IL-10-humana.

4.3 Informações clínico-epidemiológicas

Para todos os casos estudados foram obtidos e compilados dados gerais de identificação dos pacientes como idade, sexo, opção sexual, via provável de contágio pelo HIV, e informações demográficas. Foi realizada prospecção ativa de informações junto aos prontuários médicos, que disponibilizaram informações como contagem de linfócitos T (CD_4^+ e $T CD_8^+$), viremia do HIV e resposta ao tratamento antirretroviral desde o início do atendimento no hospital-dia.

4.4 Quantificação da Carga Viral do EBV

4.4.1 Quantificação do número de cópias virais

A detecção do genoma do EBV e a quantificação da carga viral nos pacientes recrutados foram realizadas por meio da técnica de qPCR com sistema Taqman[®] em termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Austrália). Os iniciadores e a sonda Taqman[®] para os experimentos de qPCR estão indicados no Quadro 1. Estes são dirigidos à região que codifica a proteína bglf5 no EBV-1 ou, no caso do EBV-2, a unidade aberta para leitura anterior à codificadora de bglf5. As sequências dos iniciadores e da sonda foram obtidas na literatura⁶².

QUADRO 1 – Sequências dos oligonucleotídeos (iniciadores e sonda Taqman[®]) utilizados para detecção e quantificação do EBV pela técnica de PCR em tempo real.

Oligonucleotídeos	Sequências (5' - 3')
BGLF.S	CCT CTT TTC CAA GTC AGA ATT TGA C
BGLF.A	TGA CCT CTT GCA TGG CCT CT
BGLF.tm	[6-FAM] - CCA TCT ACC CAT CCT ACA CTG CGC TTT ACA - [BHQ1]*

* Marcações da sonda Taqman[®]: 6-FAM - 6-carboxy fluorescein (*reporter*); BHQ1 - *black hole quencher 1* (*quencher*).

4.4.1.1 Padronização da qPCR para EBV

O protocolo definido para a pesquisa do EBV em amostras dos pacientes portadores do HIV foi testado com o DNA extraído de diferentes linhagens celulares infectadas ou não pelo EBV, gentilmente cedidas pela Prof^a. Dra. Ethel Cesarman, da Faculdade de Medicina da Universidade de Cornell, Nova Iorque, EUA. As linhagens utilizadas foram relacionadas no Quadro 2.

QUADRO 2 - Relação das linhagens celulares de doenças linfoproliferativas ocorrendo em pacientes portadores do HIV, cujo DNA foi utilizado na padronização da pesquisa do EBV por qPCR.

1. Células de linfoma de efusão primária (PEL)

1.1. Positivas para KSHV/HHV-8 somente: BCBL-1 e BCLM-1

1.2. Positivas para KSHV/HHV-8 e EBV (Latência tipo I): BC-1, BC-2 e BC-5

2. Células de linfoma difuso de grandes células B, tipo imunoblástico, EBV-positivas somente (latência tipos II/III): BCKN-1 e IBL-1.

3. Células de linfoma de Burkitt, EBV-positivas (Latência tipo I): IBL-4, LCL-JPOC e LCL-RJ.

4. Células linfoblastóides EBV-positivas (Latência tipo III): LCL-9001.

Para determinação da carga viral foi utilizada curva padrão a partir de diluição seriada de DNA do EBV disponível comercialmente (EBV-B95-8, *Advanced Biotechnologies*, Columbia, MD, USA). As alíquotas de DNA das linhagens celulares do quadro 2 foram utilizadas nas padronizações dos experimentos de qPCR para quantificação da carga viral (Figura 4), detecção das variantes de *BNFL-1* e genotipagem do EBV baseada na análise do gene viral EBNA-2, estas últimas realizadas por *nested-PCR*.

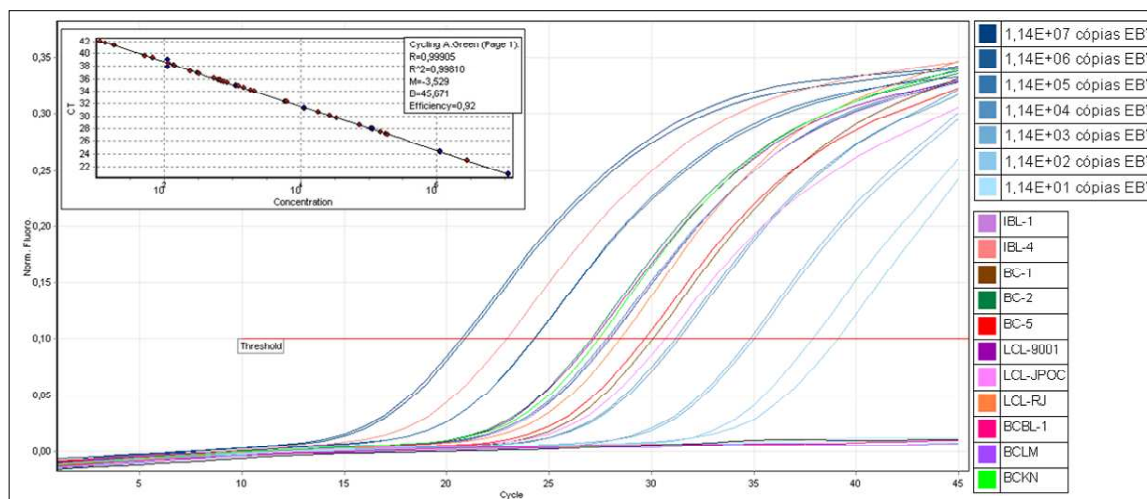


FIGURA 4 – Reação para detecção do EBV por qPCR em linhagens celulares EBV-positivas e negativas.

Durante a fase de padronização da qPCR as reações foram testadas empregando-se replicatas idênticas e replicatas reais, sempre em triplicatas. Na primeira abordagem a quantidade de DNA de três reações (12µL) foi misturada ao

volume total de reação (63µL), correspondente às triplicatas, com posterior distribuição do volume para cada reação (25µL). Esta abordagem foi importante para avaliar possíveis variações internas da reação, que podem interferir nas replicatas. Na segunda abordagem a quantidade individual de DNA (4µL) foi acrescida em cada uma das reações (21µL); a qual poderia indicar possíveis variações causadas por erros de pipetagem ou problemas na homogenização das reações. A figura 5 ilustra que os resultados obtidos para ambas as abordagens foram satisfatórios, posto que foram mínimas as variações entre as réplicas de uma mesma amostra.

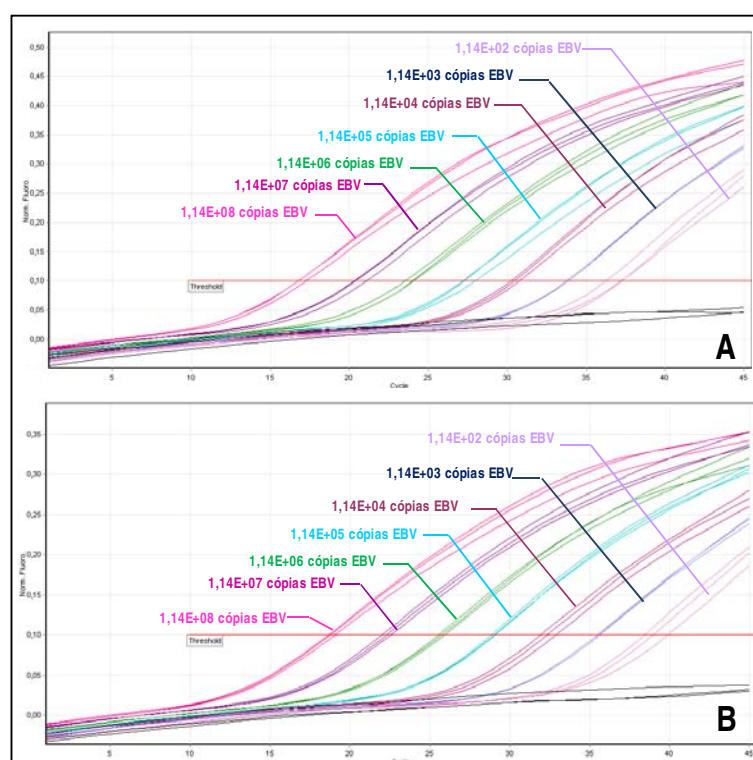


FIGURA 5 – Padronização da reação de detecção e quantificação do EBV por qPCR. A: Curva padrão em triplicatas idênticas. B: Curva padrão em triplicatas reais.

As amostras provenientes dos pacientes do estudo foram avaliadas em duplicatas pela qPCR. Foram consideradas aceitáveis variações de até 5% (definida pelo coeficiente de variação CV, tal que $CV = 100 \times \text{Desvio Ct} / \text{Média Ct}$) nos Cts obtidos das replicatas de uma mesma amostra.

4.4.2 Quantificação do número de células

A padronização da qPCR para o ERV-3 seguiu protocolo estabelecido por Yuan e colaboradores (2001), empregando os iniciadores e sonda apresentados no Quadro 3⁹⁸. O plasmídeo contendo o genoma completo do ERV-3 foi doado pela

Dra. Denise Whitby, do Instituto Nacional do Câncer em Frederick, MD, EUA (*Viral Epidemiology Section, AIDS Vaccine Program, National Cancer Institute-Frederick, Frederick, MD, USA*). Com este plasmídeo foi construída uma curva de diluição seriada de base 10 empregada nas reações de qPCR para avaliação do número de células presentes nas amostras analisadas.

QUADRO 3 – Sequências dos oligonucleotídeos (iniciadores e sonda Taqman®) utilizados para detecção e quantificação da carga viral do EBV pela qPCR.

Oligonucleotídeos	Sequências (5' - 3')
PHP10-F	CAT GGG AAG CAA GGG AAC TAA TC
PHP10-R	CCC AGC GAG CAA TAC AGA ATT T
PHP-P505.tm	[6-FAM] - TCT TCC CTC GAA CCT GCA CCA TCA AGT CA - [BHQ1]

* Marcações da sonda *Taqman*®: 6-FAM - 6-carboxy fluorescein (*reporter*); BHQ1 - *black hole quencher 1* (*quencher*).

4.5 Detecção dos genótipos do EBV

As amostras de DNA dos pacientes incluídos no estudo que tiveram carga viral para o EBV detectável pelo qPCR foram também avaliadas quanto aos genótipos virais. Para este objetivo foi utilizada *nested*-PCR com os iniciadores descritos por Telenti e colaboradores (1993)⁸¹. A genotipagem foi baseada na análise do gene viral EBNA-2, no qual estão localizadas as principais variações entre os genótipos 1 e 2 do EBV. A sequência dos iniciadores utilizados, reagentes constituintes e perfil de ciclagem das reações de PCR para genotipagem do EBV são apresentados no Quadro 4. O primeiro par de iniciadores indicados foi empregado na primeira etapa de amplificação, e o segundo par foi empregado para determinação das amostras positivas para EBV-1, enquanto o terceiro para EBV-2. A segunda etapa da *nested*-PCR foi feita em multiplex utilizando 1,25uL da reação anterior na diluição 1:100; sendo realizadas também nas diluições 1:50, ou sem diluição, nos casos em que não foi obtida amplificação no primeiro experimento.

A análise dos resultados de genotipagem do EBV foi baseada no tamanho dos *amplicons* após a *nested*-PCR, em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, com base em sequências-protótipo para o EBV-1 (B95.8 – GenBank *Accession* #V01555²) e EBV-2 (AG876 – GenBank *Accession* #DQ279927.1²⁰). Os tamanhos esperados para os *amplicons* foram 497pb e 150bp para EBV-1 e EBV-2, respectivamente.

QUADRO 4 - Sequências dos iniciadores da reação para genotipagem de EBV-1 e EBV-2, reagentes constituintes da reação de PCR e perfil de ciclagem.

	Sequências iniciadores 5'-3'	Reagentes	Perfil de Ciclagem
EBNA-2C.S ⁸¹	AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4 / KCl 70mM), 2,0mM MgCl ₂ , 0,25 mM	94°C – 5'; 94°C – 1,5', 58°C – 1', 72°C – 1'
EBNA-2.A ⁸¹	TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA T	cada dNTP, 1,0U DNA polimerase (Taq) e 0,3 µM de cada iniciador.	(40x); 72°C – 10'
EBNA.EBV-1.S ⁸¹	TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4 / KCl 70mM), 2,0mM MgCl ₂ , 0,25 mM	94°C – 5'; 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 1'
EBNA.EBV-1.A ⁸¹	ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C	cada dNTP, 1,0U DNA polimerase (Taq) e 0,3 µM de cada iniciador.	(25x); 72°C – 10'
EBNA.EBV-2.S ⁸¹	CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4 / KCl 70mM), 2,0mM MgCl ₂ , 0,25 mM	94°C – 5'; 94°C – 30", 58°C – 30", 72°C – 1'
EBNA.EBV-2.A ⁸¹	AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG	cada dNTP, 1,0U DNA polimerase (Taq) e 0,3 µM de cada iniciador.	(25x); 72°C – 10'

4.6 Detecção das variantes de BNLF-1

As amostras que tiveram carga viral para EBV detectáveis pelo qPCR foram submetidas a *nested*-PCR para detecção das variantes de *BNLF-1*. A Tabela 2 apresenta os iniciadores utilizados, reagentes constituintes da reação e perfil de ciclagem. Os iniciadores permitiam identificar a deleção de 30pb no gene BNLF-1 do EBV, obtendo-se *amplicon* de 130pb e/ou 160pb para os casos com ou sem a deleção, respectivamente. Na segunda etapa da *nested*-PCR foi utilizado 1,0 µL da reação anterior na diluição 1:10; ou sem diluição, nos casos em que não houve amplificação na primeira tentativa. Os resultados foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

TABELA 2 – Sequências dos iniciadores da reação para detecção das variantes de BNLF-1, reagentes constituintes da reação de PCR e perfil de ciclagem, de ambas as etapas da reação de *nested*-PCR.

	Sequências iniciadores 5'-3'	Reagentes	Perfil de Ciclagem
EBV.LMP1.S	AAC GCA CTT TCT CCT CTT TCC	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4 / KCl 70mM), 1,5mM MgCl ₂ , 0,2 mM cada dNTP, 1,0U DNA polimerase (Taq) e 0,2 µM de cada iniciador.	94°C – 5'; 94°C – 20", 60°C – 10", 72°C – 20" (25x); 72°C – 10'
EBV.LMP1.A	AGC CTAT GAC ATG GTA ATG C		
LMP-1A	GTG GGG GTC GTC ATC ATC TC	Tampão (Tris-Cl 28mM pH 8,4 / KCl 70mM), 2,0mM MgCl ₂ , 0,2 mM cada dNTP, 1,0U DNA polimerase (Taq) e 0,2 µM de cada iniciador.	94°C – 5'; 94°C – 20", 58°C – 20", 72°C – 20" (35x); 72°C – 10'
LMP-1S	CGG AAG AGG TGG AAA ACA AA		

5 Resultados

5.1 Levantamento dos dados clínico-epidemiológico

Os dados gerais de identificação dos pacientes, contagem de linfócitos T CD_4^+ e CD_8^+ , carga viral do HIV (quantificada no momento do recrutamento para o estudo), resposta à HAART e estágio da infecção pelo HIV segundo a classificação do CDC¹⁰, foram compilados e estão apresentados no Apêndice A.

Dentre os 156 pacientes recrutados, 110 (70,5%) eram caucasianos, 14 (9,0%) afro-brasileiros, 30 (19,2%) pardos e 2 (1,3%) índios. Com relação a opção sexual declarada, 123/156 (78,8%) pacientes declararam-se heterossexuais, 19/156 (12,2%) bissexuais e 14/156 (9,0%) eram homens que tiveram relações sexuais com outros homens (HSH). Relação heterossexual foi a via mais provável de contágio pelo HIV declarada pela maioria dos participantes do estudo (121/156, 77,7%), seguida de relação homossexual (23/156, 14,7%), uso de drogas injetáveis (UDI – 5/156, 3,2%), transfusão sanguínea (4/156, 2,6%), vertical (1/156, 0,6%) e outros (2/156, 1,2%). Com relação à HAART, 20/156 (12,8%) não estavam em tratamento por um período de 6 meses anteriores ao momento do recrutamento para o estudo, e 63/156 (40,4%) não apresentavam falha terapêutica. 129/156 (82,7%) pacientes já haviam apresentado em algum momento a presença de doença definidora de aids.

5.2 Quantificação da Carga Viral do EBV

A carga viral do EBV em PBMC pode ser detectada em 123/156 (78,8%) dos pacientes do estudo. Como parâmetros de análise da qualidade das reações de qPCR foram sistematicamente avaliados a eficiência, o *slope* e o R^2 obtidos em cada reação. Esses parâmetros indicam, respectivamente, a eficiência de amplificação do experimento, a inclinação da reta e o coeficiente de correlação entre a regressão linear da curva-padrão e os valores de Cts (*threshold cycle*) obtidos para cada uma das amostras-padrão. O valor ideal de *slope* é -3,23, obtido quando a reação alcança eficiência máxima de amplificação (100%). Já o valor esperado de R^2 é 1 (um). Durante os experimentos, esses parâmetros oscilaram próximo aos seus valores ideais (Quadro 5).

QUADRO 5 – Síntese dos parâmetros de qualidade das reações de qPCR empregadas para pesquisa do EBV por qPCR.

Data do experimento	Parâmetros da qPCR			Amostras	Fig.
	E	Slope	R ²		
01/12/2008	0,89	-3,620	0,99910	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28	6A
02/12/2008	0,93	-3,510	0,99851	29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56	6B
08/12/2008	0,93	-3,513	0,99594	57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83 e 84	6C
09/12/2008	0,96	-3,432	0,99655	85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 e 112	6D
11/12/2008	0,92	-3,529	0,99810	113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 e 129	6E
03/02/2009	0,88	-3,658	0,99682	135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, e 143	6F
04/02/2009	0,97	-3,404	0,99879	130, 131, 132, 133, 134, 144, 145, 146, 147, 148 e 149	6G
06/02/2009 ⁽¹⁾	0,98	-3,379	0,99101	144, 145, 146, 147, 148, 149, 159, 151, 152, 153 e 154	6H
06/02/2009 ⁽²⁾	1,00	-3,320	0,99534	155, 156, 157, 158, 159, 160, 23, 25, 32 e 33	6I
06/02/2009 ⁽³⁾	0,94	-3,467	0,99655	15, 19, 28, 31, 36, 38, 40, 43, 45, 57 e 65	6J
09/02/2009	0,96	-3,432	0,99534	46, 47, 48, 50, 51, 54, 75, 79, 88, 100 e 101	6K
02/04/2009	0,94	-3,486	0,99817	05, 16, 51, 79, 223, 146, 148, 150 e 152	6L
19/11/2009	0,95	-3,442	0,99515	16, 59, 60, 92, 108, 130, 135, 139, e 137	6M

(1), (2) e (3) referem-se a três diferentes reações realizadas em 06/02/2009.

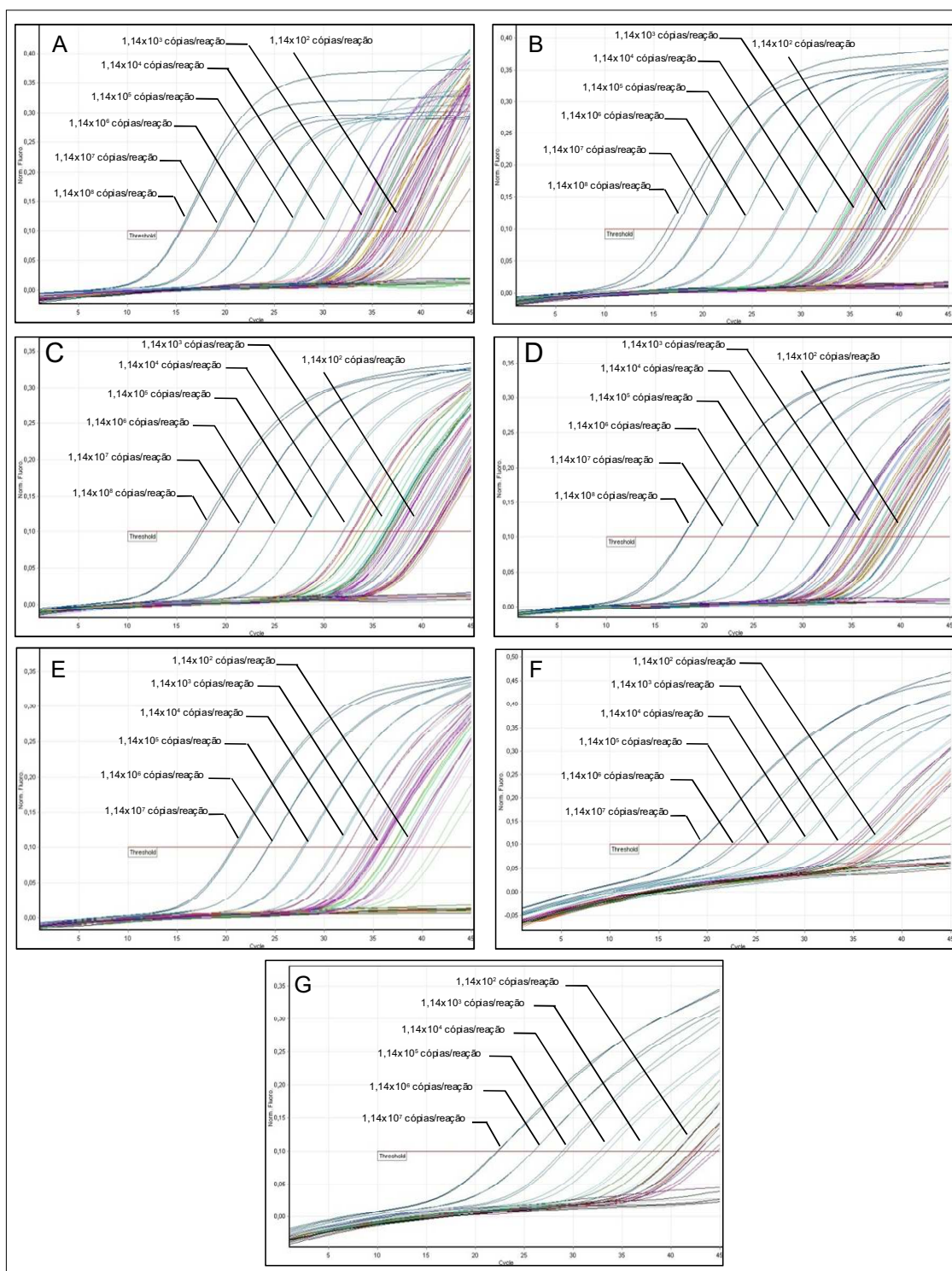


FIGURA 6 – Gráficos de amplificação de bgfl-5 do EBV por qPCR. As datas do experimento, parâmetros da qPCR analisados e amostras avaliadas estão listados no quadro 6.

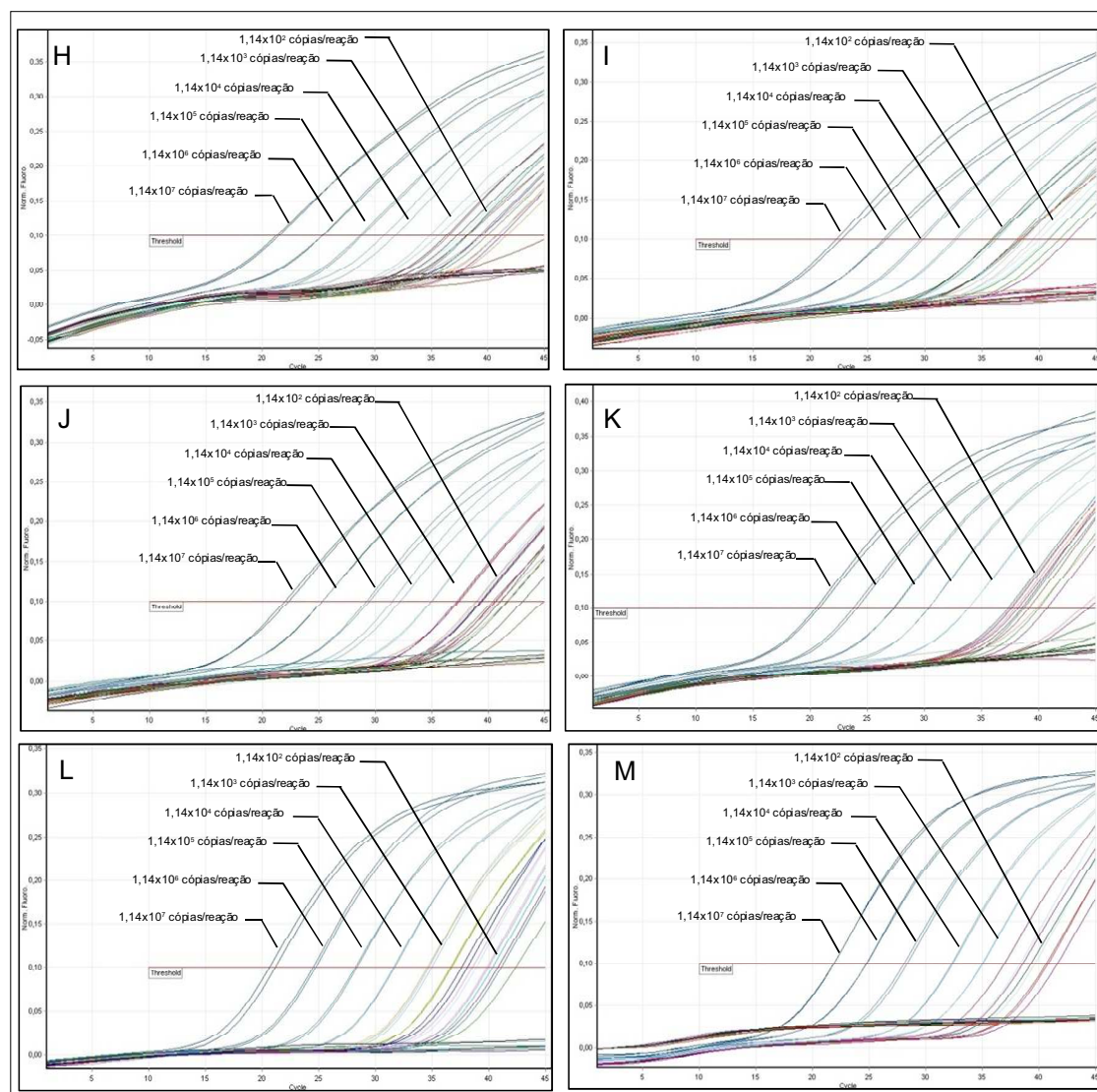


Figura 6 – Continuação.

5.3 Quantificação do número de células

Para cálculo do número de células por reação foi realizado qPCR para detecção de fragmento de 135pb da sequência do ERV-3. O número de cópias calculados para ERV-3 foi dividido por 2 (dois) para estimativa do número de células, visto que a análise foi feita em células diplóides. O Quadro 6 apresenta os parâmetros analisados para cada reação, e a Figura 7 ilustra os gráficos das reações.

QUADRO 6 – Síntese dos parâmetros de qualidade das reações de qPCR empregadas para pesquisa do ERV-3.

Data do experimento	Parâmetros da qPCR			Amostras	Fig.
	Eficiência	Slope	R ²		
04/11/2009	0,87	-3,669	0,99964	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 26, 27, 28, 30, 31, 35, 36, 39, 40 e 41	7A
05/11/2009	0,85	-3,74	0,99627	42, 43, 48, 49, 50, 51, 54, 56, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 76, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84 e 85	7B
06/11/2009	0,84	-3,787	0,99942	86, 87, 88, 90, 91, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 113, 114, 115, 116, 118, 119, 121 e 123	7C
10/11/2009	0,83	-3,824	0,99912	125, 126, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 141, 143, 145, 146, 147, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159 e 160	7D
11/11/2009	0,90	-3,59	0,99829	16, 32, 38, 45, 59, 60, 65, 92, 100, 130, 135, 139 e 148	7E

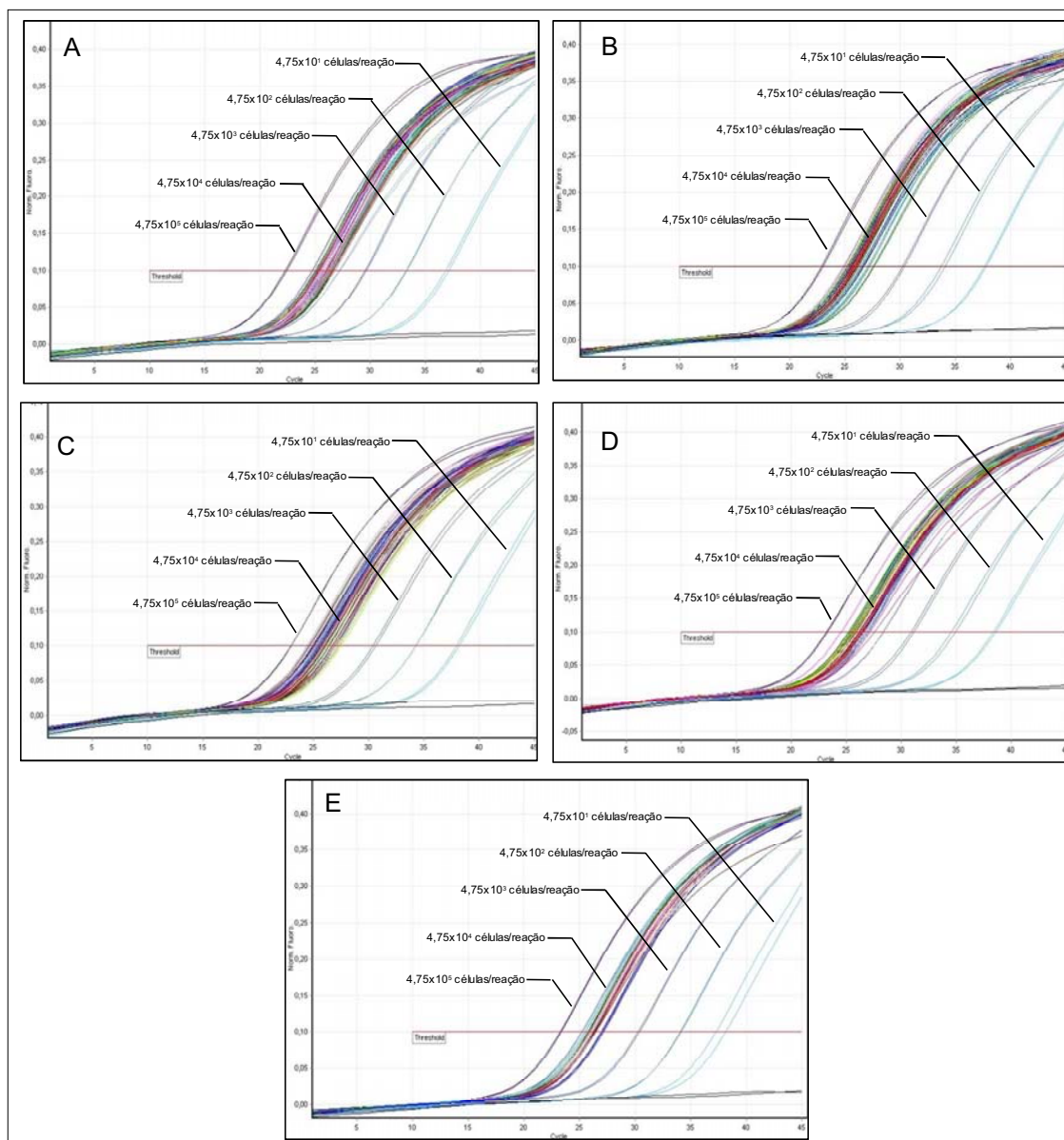


FIGURA 7 - Gráficos de amplificação de segmento do envelope de ERV-3 por qPCR. As datas do experimento, parâmetros da qPCR analisados e amostras avaliadas estão listados no quadro 7.

5.4 Cálculo da carga viral do EBV

A análise dos resultados das leituras de amplificação para bglf-5 do EBV e de segmento do envelope viral para ERV-3 revelou pequena variação entre as réplicas das amostras, indicando reprodutibilidade entre os experimentos e consistência dos resultados de quantificação. Como pode ser observado na Figura 8, a linearidade das réplicas de amplificação foi de 86,9% para o cálculo das cópias virais e de 97,3% para o cálculo do número de células.

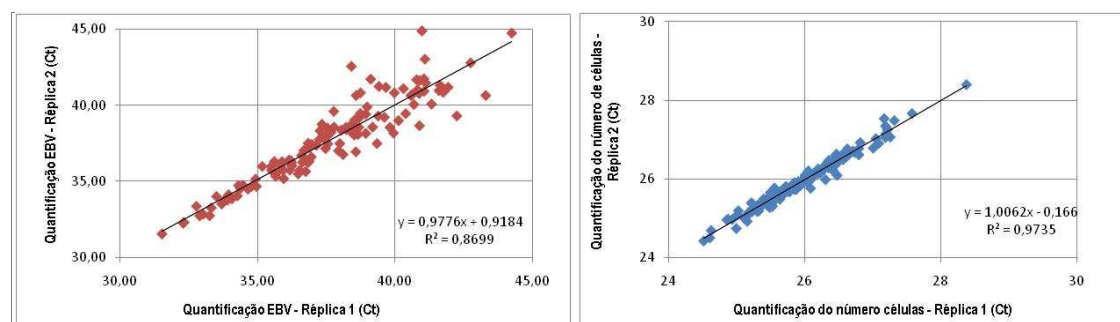


FIGURA 8 - Avaliação da reprodutibilidade dos resultados da quantificação para EBV (à esquerda) e ERV-3 (à direita). Os gráficos demonstram as correlações obtidas entre os Cts das duas replicatas avaliadas para cada amostra do estudo.

Para cálculo da carga viral do EBV foi utilizado valor médio do número de cópias de EBV por reação dividido pela média do número de células por reação. Para isso, foi realizada análise estatística para verificar a reprodutibilidade das réplicas obtidas tanto para EBV quanto para ERV-3.

TABELA 3 – Valores médios dos Cts obtidos nas reações de qPCR para EBV e para ERV-3.

Réplicas	EBV	ERV-3
Média obtida para Ct1	37,6093	25,9685
(Variação Cts1)	(31,54 – 44,24)	(24,51 – 28,37)
Média obtida para Ct2	37,6866	25,9648
(Variação Cts2)	(31,57 – 44,88)	(24,43 – 28,40)
Valor de p^*	0,8236	0,9665

* Teste de t pareado

A tabela 3 indica que não houve diferença significativa entre as réplicas 1 e 2 do EBV, assim como entre as réplicas 1 e 2 do ERV-3. Assim, demonstrou-se que as réplicas 1 e 2 do EBV poderiam ser arbitrariamente associadas às réplicas 1 e 2 do ERV-3 para cada amostra avaliada (Figura 9). Como pode ser observado na Figura 10, a linearidade das réplicas de carga viral do EBV/célula foi de 96,5%.

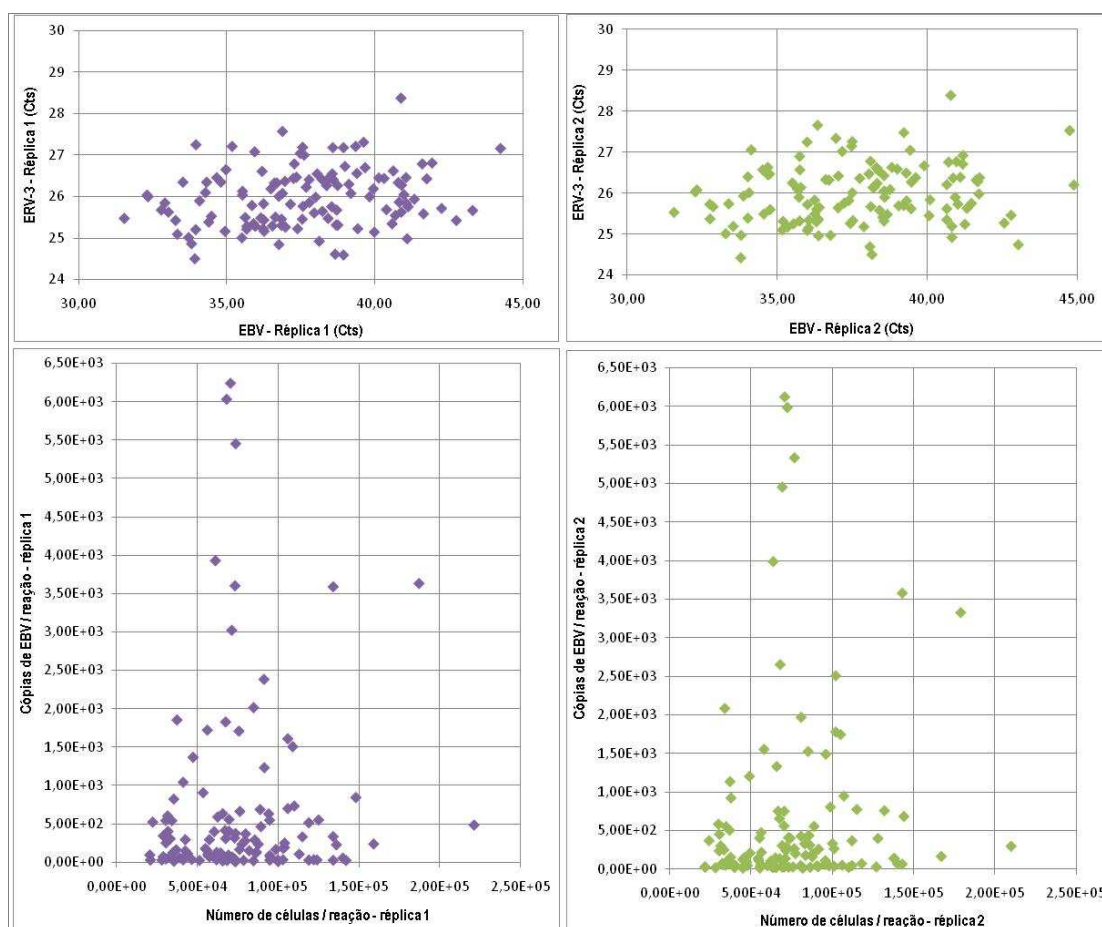


FIGURA 9 - Avaliação da reprodutibilidade das associações entre os Cts do EBV e do ERV-3 (porção superior da figura) e de cópias virais por número de células (porção inferior da figura) obtidos nas réplicas 1 (à esquerda) e réplicas 2 (à direita) para cálculo da carga viral do EBV/célula.

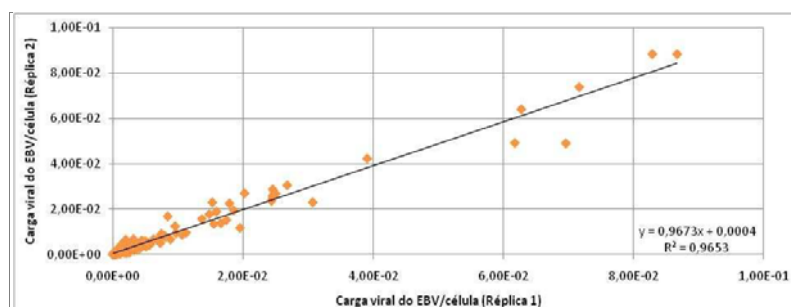


FIGURA 10 – Correlações obtidas entre a média das carga virais para cada amostra do estudo entre as réplicas 1 e 2.

Os resultados obtidos nas reações de qPCR e a carga viral calculada para cada réplica assim como as médias calculadas para os Cts obtidos, cópias de EBV, número de células e carga viral média estão apresentados no Apêndice B.

A carga viral média encontrada entre os pacientes do estudo foi $6,9 \times 10^{-3}$ cópias de EBV por célula (variação de 0 a $8,7 \times 10^{-2}$). Os resultados da carga viral obtidos foram avaliados com relação as informações clínico-epidemiológicas levantadas dos prontuários-médico dos pacientes participantes do estudo. O quadro 7 mostra as associações avaliadas.

QUADRO 7 – Testes estatísticos empregados nas associações avaliadas entre informações clínico-epidemiológicas dos pacientes e os resultados obtidos com carga viral do EBV, genotipagem e variantes de BNLF-1. As casas com destaque em laranja mostram associações com significância estatística ($p < 0,05$).

Informações dos pacientes	Variação BNLF-1	Genotipagem do EBV	Carga viral EBV
Idade	0,8420 Tukey	0,9002 Tukey	0,7659 Spearman
Sexo	0,6879 qui-quadrado	0,2699 Fisher	0,8028 Kruskal-Wallis
Opção Sexual declarada	0,2753 Fisher	0,7300 Fisher	0,5267 Kruskal-Wallis
Via presumida de contágio	0,2791 Fisher	0,3356 Fisher	0,3028 Kruskal-Wallis
Etnia	0,4742 Fisher	0,3187 Fisher	0,3040 Kruskal-Wallis
Tempo estimado de infecção pelo HIV	0,4073 qui-quadrado	0,5677 qui-quadrado	0,0026 Spearman
CDC – Sintomas aids	0,9999 Fisher	0,5715 Fisher	0,5641 Kruskal-Wallis
CDC – Níveis históticos de células T CD ₄ ⁺	0,4234 Fisher	0,0272 Fisher	0,7741 Kruskal-Wallis
Resposta ao tratamento antirretroviral	0,7052 qui-quadrado	0,6228 Fisher	0,0076 Kruskal-Wallis
Viremia do HIV	0,7132 Kruskal-Wallis	0,1976 Kruskal-Wallis	0,0005 Spearman
Contagem de linfócitos TCD ₄ ⁺	0,3480 qui-quadrado	0,4626 qui-quadrado	0,7331 Spearman
Contagem de linfócitos TCD ₈ ⁺	0,9851 qui-quadrado	0,7578 qui-quadrado	0,0159 Spearman
Carga viral do EBV	0,8065 Kruskal-Wallis	0,0205 Kruskal-Wallis	-
Genotipagem do EBV	0,3764 Fisher	-	-

Pacientes sem tratamento antirretroviral nos últimos 6 meses e os que tiveram falha terapêutica à HAART apresentaram cargas virais de EBV maiores que indivíduos sem falha terapêutica ou inclassificáveis ($p=0,0076$) (Tabela 4).

TABELA 4 – Análise das medianas da carga viral obtida pela qPCR em relação às respostas à HAART.

Resposta ao tratamento	Carga Viral do EBV			<i>p</i>
	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	
Sem Tratamento	4,48x10 ⁻⁰³	5,64x10 ⁻⁰⁴	1,96x10 ⁻⁰²	0,0076
Sem falha terapêutica	6,05x10 ⁻⁰⁴	0,00	4,63x10 ⁻⁰³	
Com falha terapêutica	4,63x10 ⁻⁰³	1,49x10 ⁻⁰³	1,54x10 ⁻⁰²	
Inclassificável	6,09x10 ⁻⁰⁴	0,00	3,73x10 ⁻⁰³	

Teste de Kruskal-Wallis

Quanto maior a carga viral do HIV no momento do recrutamento dos pacientes, maior a carga viral do EBV detectada. Esta associação também foi encontrada com relação ao tempo de infecção estimado pelo HIV, ou seja, quanto maior o tempo de infecção por este retrovírus, maior a carga viral do EBV encontrada. Com relação à contagem de linfócitos T CD₈⁺ no momento do recrutamento, esta também apresentou uma associação direta com o EBV, assim quanto maiores os níveis de células T CD₈⁺, maiores as cargas virais calculadas (Tabela 5). Os demais parâmetros, como idade, sexo, etnia, opção sexual declarada, via presumida de contágio e níveis de linfócitos T CD₄⁺ não apresentaram diferença estatística significativa.

TABELA 5 – Correlação entre carga viral do EBV e carga viral do HIV, tempo estimado de infecção pelo HIV e contagem de linfócitos T CD₄⁺ e CD₈⁺.

Parâmetros	Carga viral do HIV	Tempo estimado de infecção pelo HIV (anos)	Níveis de linfócitos T CD ₄ ⁺	Níveis de linfócitos T CD ₈ ⁺
Carga viral do EBV	rho=0,27614 p=0,0005	rho= 0,24164 p=0,0026	rho=-0,02752 p=0,7331	rho=0,19286 p=0,0159

5.5 Genotipagem dos isolados virais do EBV

Das 156 amostras avaliadas, 123 (78,9%) tiveram carga viral do EBV detectável. Destas foi possível amplificação para EBNA-2 e genotipagem do EBV em 95/123 (77,2%) amostras, das quais 72 (75,8%) revelaram infecção pelo EBV-1, 9 (9,5%) pelo EBV-2 e 14 (14,7%) apresentavam co-infecção entre os EBVs 1 e 2. As figuras 11 e 12 mostram os géis obtidos das reações de *nested*-PCR para EBNA-2 para a maioria das amostras do estudo. As amostras que não amplificaram foram repetidas em outra reação de *nested*-PCR utilizando 1,25µL do amplificado da primeira reação sem a diluição empregada nas demais amostras (Figura 12).

A maioria dos pacientes infectados com o EBV tipo 1 ou o EBV tipo 2 apresentaram classificação CDC 3, com relação à contagem de células T CD₄⁺, ou seja, menor que 200 células/µL de sangue, enquanto indivíduos coinfectados pelos EBVs 1 e 2 foram classificados como CDC2, contagem de linfócitos T CD₄⁺ entre 200 e 499 células/µL de sangue ($p = 0,0272$). Esta associação não foi encontrada com relação aos diferentes genótipos do EBV e a classificação CDC baseada no sintomas de aids (Tabela 6).

TABELA 6 – Análise dos diferentes genótipos do EBV de acordo com a classificação CDC.

Classificação CDC	Genotipagem do EBV			Total	p
	EBV-1	EBV-2	Co-infecção EBV-1 e EBV-2		
Sintomas Aids					
A	26/69 (37,7)	3/9 (33,3)	8/14 (57,1)	37/92 (40,2)	0,5715
B	9/69 (13,0)	0	1/14 (7,1)	10/92 (10,9)	
C	34/69 (49,3)	6/9 (66,7)	5/14 (35,8)	45/92 (48,9)	
*Contagem T CD ₄ ⁺					
1	4/68 (5,9)	1/9 (11,1)	2/13 (15,4)	7/90 (7,78)	0,0272 [†]
2	22/68 (32,4)	1/9 (11,1)	8/13 (61,5)	31/90 (34,44)	
3	42/68 (61,7)	7/9 (77,8)	3/13 (23,1)	52/90 (57,78)	

* 1: Acima de 500 linfócitos T CD₄⁺/µL; 2: Entre 200 e 499 linfócitos T CD₄⁺/µL; 3: Inferior a 200 linfócitos T CD₄⁺/µL. † Teste de Kruskal-Wallis

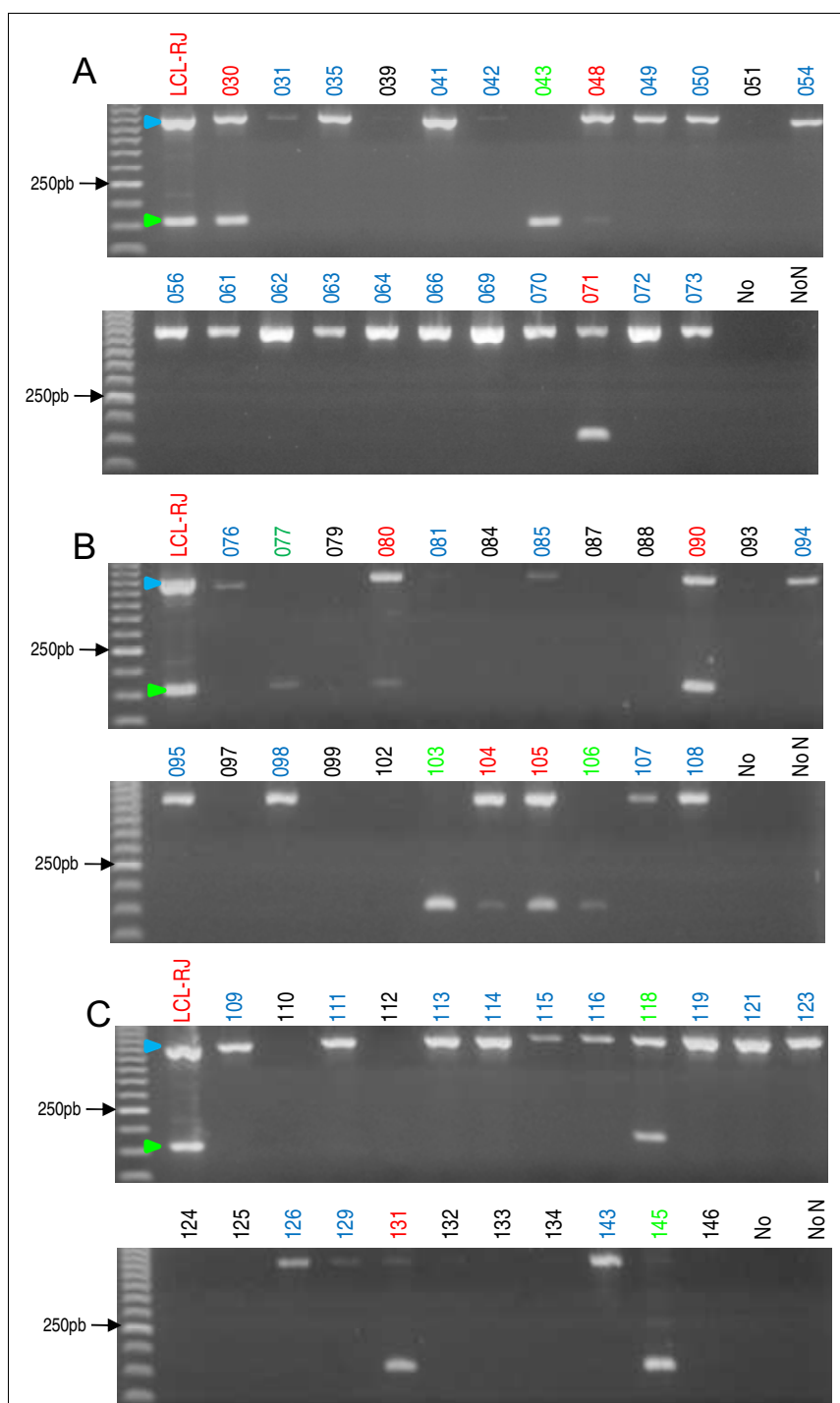


FIGURA 11 – Genotipagem baseada na amplificação de EBNA-2 do EBV. Banda de 497pb esperada para EBV-1, e 150pb esperada para EBV-2. Amostras em azul são EBV-1-positivas, amostras em verde são positivas para EBV-2 e as indicadas em vermelho são co-infectadas pelos EBVs 1 e 2. Amostras em preto não amplificaram. LCL-RJ: células de linfoma de Burkitt, co-infectadas com EBVs tipos 1 e 2, note banda de 497pb indicada em azul (cabeça de seta) e a de 150pb indicada em verde (cabeça de seta). No: Amostras sem DNA, NoN: Amostra sem DNA da *nested*-PCR. M: marcador de peso molecular de 50pb, seta indica banda de 250pb do marcador.

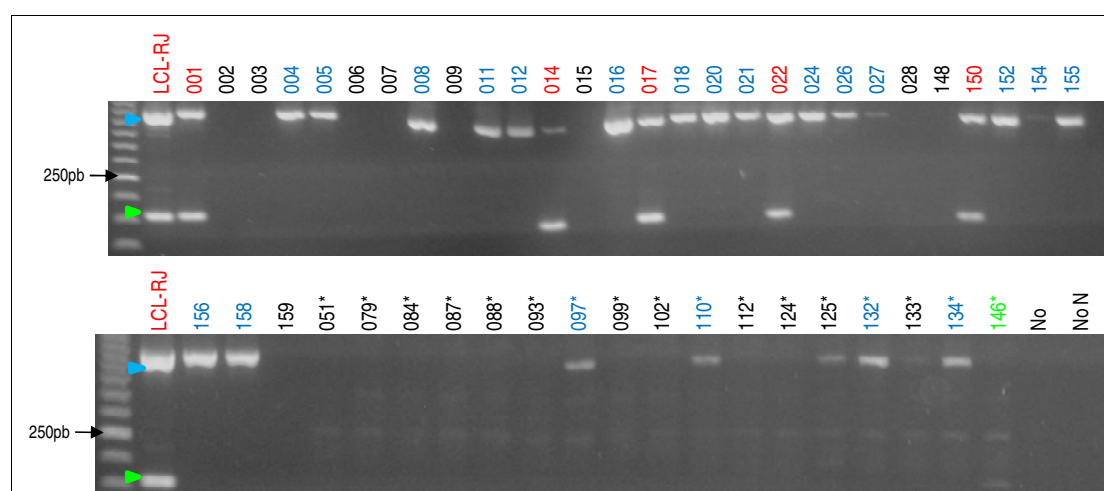


FIGURA 12 - Genotipagem baseada na amplificação de EBNA-2 do EBV. Banda de 497pb esperada para EBV-1, e 150pb esperada para EBV-2. Amostras em azul são EBV-1-positivas, amostras em verde são positivas para EBV-2 e as indicadas em laranja são co-infectadas pelos EBVs 1 e 2. Amostras em preto não amplificaram. LCL-RJ: células de linfoma de Burkitt, co-infectadas com EBVs tipos 1 e 2, note banda de 497pb indicada em azul (cabeça de seta) e a de 150pb indicada em verde (cabeça de seta). No: Amostras sem DNA, NoN: Amostra sem DNA da *nested*-PCR. M: marcador de peso molecular de 50pb, seta indica banda de 250pb do marcador.
* Amostras que não amplificaram na primeira *nested*-PCR, foram repetidas utilizando 1,25µL de amplificado da primeira reação sem diluir.

A mediana da carga viral do EBV detectada foi maior entre indivíduos coinfetados com os EBVs 1 e 2, quando comparados com os pacientes com infecções isoladas de EBV-1 e EBV-2 (Tabela 7).

TABELA 7 – Relação das medianas das cargas virais do EBV com os diferentes genótipos do EBV.

Genótipos EBV	Carga Viral do EBV			Total
	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	
EBV-1	3,77594E-03	1,58986E-03	9,93635E-03	
EBV-2	1,34462E-03	4,91171E-04	6,03741E-03	0,0205
EBV-1 e EBV-2	1,75647E-02	3,72928E-03	2,858319E-02	

Teste de Kruskal-Wallis

As análises envolvendo idade, sexo, etnia, opção sexual, vias de contágio, tempo de infecção pelo HIV, resposta à HAART, carga viral do HIV e níveis de linfócitos T CD₄⁺ e CD₈⁺ não revelaram diferenças estatística significativas com relação aos diferentes genótipos de EBV.

5.6 Detecção das Variantes de BNLF-1

Dos 123 casos que apresentaram carga viral para o EBV detectável, 99/123 (80,5%) apresentaram amplificação para BNLF-1, sendo que 49/99 (49,5%) possuíam a versão sem a deleção, de 160pb, enquanto 50/99 (50,5%) apresentaram a deleção de 30pb. As figuras 13 e 14 ilustram a maior parte dos casos avaliados no estudo. As amostras que não amplificaram foram repetidas em outra reação de *nested*-PCR utilizando 2,0uL do amplificado da primeira reação na diluição 1:50 ou sem diluir (Figura 14).

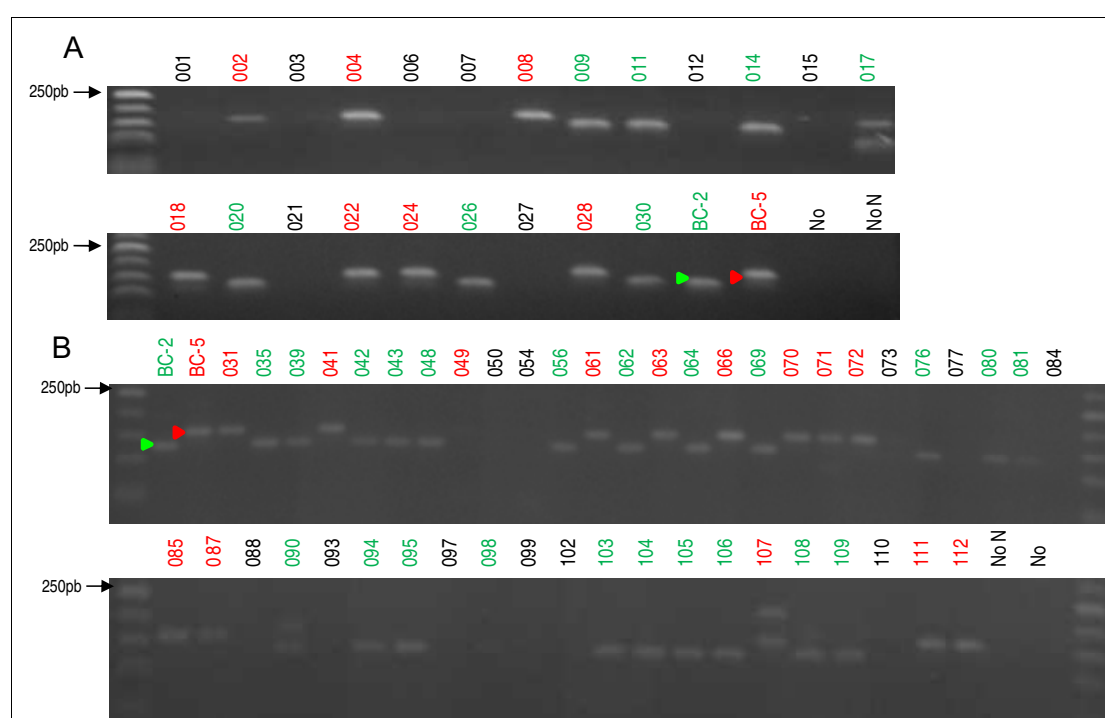


FIGURA 13 – Detecção das variantes de BNLF-1 do EBV. A e B: Amostras indicadas em laranja apresentam a variante sem a deleção de 30pb, enquanto as indicadas em azul apresentam a deleção (banda de 130pb). Amostras em preto não amplificaram. No: Amostras sem DNA; NoN – No da reação de *nested*-PCR; M: Marcador de 50pb, seta mostra banda de 250pb do marcador; BC-2 e BC-5: linhagens celulares de linfoma de efusão primário com e sem a deleção de 30pb; indicadas as bandas de 130pb e 160pb nas cabeças de seta verde e vermelha, respectivamente. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

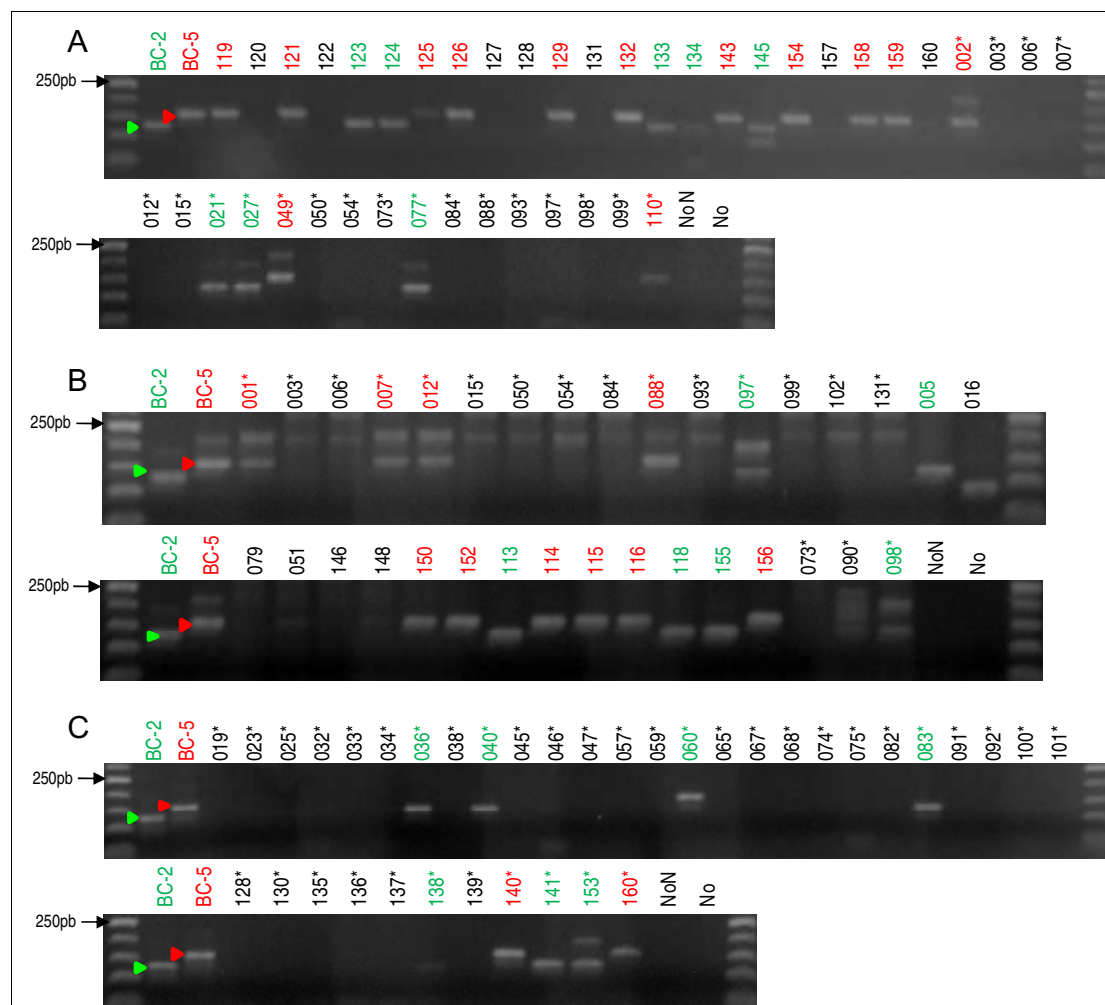


FIGURA 14 - Detecção das variantes de BNLF-1 do EBV. A, B e C: Amostras indicadas em laranja apresentam a variante sem a deleção de 30pb, enquanto as indicadas em azul apresentam a deleção (banda de 130pb). Amostras em preto não amplificaram. No: Amostras sem DNA; NoN – No da reação de *nested*-PCR; M: Marcador de 50pb, seta mostra banda de 250pb do marcador; BC-2 e BC-5: linhagens celulares de linfoma de efusão primária com e sem a deleção de 30pb; indicadas as bandas de 130pb e 160pb nas cabeças de seta verde e vermelha, respectivamente. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.* Indicam amostras que não amplificaram na reação de *nested*-PCR e posteriormente foram repetidas, utilizando 1,0µL do amplificado da primeira reação sem diluir.

As análises envolvendo idade, sexo, etnia, opção sexual, vias de contágio, tempo de infecção pelo HIV, classificação CDC, resposta à HAART, carga viral do HIV, níveis de linfócitos T CD₄⁺ e CD₈⁺, carga viral e genotipagem do EBV não revelaram diferenças estatística significativas em relação às variantes de BNLF-1.

6 Discussão

A quantificação da carga viral do EBV é o objetivo de vários estudos envolvendo portadores de doenças associadas ao EBV, indivíduos doadores de sangue e em pacientes infectados pelo HIV^{18,22,43,50,69}. Entretanto, o grande problema para avaliação destes resultados está nas diferentes unidades utilizadas para expressar a carga viral. São poucos os estudos que demonstram os resultados em números absolutos de cópias de EBV por número de células, a grande maioria utiliza cópias virais por 10⁶ PBMC, mL de sangue, mL de plasma ou ng de DNA. E estas diferenças nas unidades dificultam a comparação dos resultados.

Destarte, o presente estudo avaliou a carga viral em número absoluto de cópias de EBV por número de células conforme descrito por Yuan e colaboradores (2001)⁹⁸. Para isto os autores utilizaram um retrovírus endógeno (*Endogenous Retrovirus* – ERVs) para quantificar o número de células humanas por qPCR, o HERV-R ou ERV-3, o qual está localizado na posição 7q11.2⁴². Os autores demonstraram que a detecção e quantificação de ERV-3 é precisa, com alta sensibilidade e especificidade. Sendo utilizada como uma ferramenta apurada na determinação da carga viral, permite a expressão dos resultados em cópias virais por número de células⁹⁸.

Em amostras de doadores de sangue, o EBV foi detectado por qPCR em 72,0% (72/100) dos casos, com a mediana da carga viral inferior a 47 cópias do vírus/mL sangue³⁷. Já em amostras de pacientes portadores de HIV submetidos à HAART, o vírus foi detectado em 57/70 (81,0%) das amostras de PBMC e em 55/68 (79,0%) das de saliva, sendo que as cargas virais médias foram de 1,79 cópias/500ng de DNA de PBMC e 3,45 cópias de EBV/500ng de DNA, respectivamente. Entre indivíduos não-infectados pelo HIV a frequência de detecção e a carga viral do EBV foi significativamente menor⁵⁰. Em outro estudo empregando sistema *Taqman*[®], com sonda para BNLF-1 do EBV, não foram observadas diferenças significativas entre as cargas virais dos grupos de pacientes com e sem infecção pelo HIV. Foi detectada carga viral em 61 dos 113 (54,0%) pacientes com HIV, com valores de 1.154; 402 e 3.505 cópias/10⁶ PBMC para os quartis mediano, inferior e superior, respectivamente¹⁸.

Martelius e colaboradores (2009) analisaram 62 indivíduos não-transplantados que apresentaram sorologia positiva para o EBV por qPCR, no período de 2000-2007. Destes, 15/62 (24,2%) eram imunocompetentes, dos 47

(75,8%) restantes, 7 eram HIV-positivos e 36 apresentavam cânceres, principalmente hematológicos (dentre os quais 3 também eram HIV-positivos). O grupo de pacientes imunocomprometidos apresentou taxa de mortalidade de 42%, sendo a carga viral do EBV na última amostra de seguimento do estudo indetectável (<500 cópias/mL de plasma) em 11 pacientes, <10.000 cópias/mL de plasma em 17 indivíduos e >10.000 cópias/mL de plasma nos 8 restantes. O pico de viremia (>10.000 cópias/ml de plasma) do EBV foi de 13,0% (2/15) nos imunocompetentes e 40,0% (19/47) nos imunocomprometidos, com média de detecção de 4.202 ± 3.186 cópias/ml de plasma e 115.682 ± 328.056 cópias/ml de plasma (Teste de Aspin-Welch $p = 0,024$), respectivamente⁵².

Alguns estudo demonstram que pacientes portadores do HIV tratados com HAART tendem a apresentar aumento do número de linfócitos T CD₄⁺ e diminuição da carga viral do HIV. Entretanto, não é relatada alteração significativa na carga viral do EBV^{57,60,79}. Stevens e colaboradores (2002) avaliaram a carga viral do EBV em 109 pacientes tratados com HAART, sem medicamento anti-herpético, e 99 portadores do HIV que receberam monoterapia. Dentre os pacientes que receberam HAART, 22/64 (59,0%) apresentaram elevada carga viral do EBV (2.000 ± 89.400 cópias do EBV/mL sangue). Os indivíduos tratados com monoterapia foram analisados dois momentos: na primeira coleta, 28/35 (43,0%) das amostras positivas para EBV tinham carga viral variando de 2.400 a 90.480 cópias de EBV/mL de sangue, enquanto 30/56 (53,6%) amostras positivas para EBV na última coleta apresentaram alta carga viral (2.000 a 130.100 cópias DNA EBV/ml sangue). Os autores não encontraram diferenças significativas entre os pacientes com ou sem tratamento com HAART, reforçando a hipótese de que a HAART não altera a carga do EBV⁷⁹.

O'Sullivan e colaboradores (2002) analisaram a carga viral do EBV em 24 pacientes infectados pelo HIV, incluindo pacientes sem tratamento ou no início de um regime de tratamento com inibidor de protease e com contagem de linfócitos T CD₄⁺ <150/μL de sangue. A média da carga do EBV detectável no momento 0 (pré-HAART) foi < 1 cópia EBV/10⁶ leucócitos; 5 cópias EBV/10⁶ leucócitos no momento 1 (média de 33 dias após momento 0); 10 cópias EBV/10⁶ leucócitos no momento 2 (média de 87 dias após momento 0) e 7 cópias EBV/10⁶ leucócitos no momento 4 (média de 385 dias após momento 0). Os autores comentam que nos pacientes que

respondem bem à HAART há um aumento na carga viral do EBV que é controlada aproximadamente 1 ano após o início do regime antirretroviral⁵⁷.

No presente estudo foi encontrada carga viral do EBV mais elevada em pacientes sem tratamento antirretroviral nos 6 meses anteriores ao recrutamento, e nos que apresentaram falha terapêutica quando comparados aos sem falha terapêutica. Relacionando pacientes com e sem falha de terapia, podemos analisar duas hipóteses, a primeira seria paradoxal com a maioria dos estudos indicando que a HAART influencia na replicação do EBV; e a segunda, a diminuição de linfócitos T CD₄⁺ e aumento na viremia do HIV apresentados pelos pacientes com falha terapêutica, caracteriza acentuada deficiência do sistema imunitário, criando ambiente favorável a replicação do EBV. Já os pacientes sem tratamento, não estão expostos à HAART, mas também não possuem uma resposta imunitária tão eficaz quanto os indivíduos que não apresentam a infecção pelo HIV, uma vez que o tratamento antirretroviral só é iniciado quando a contagem de linfócitos T CD₄⁺ atinge 200 células/ μ L de sangue.

A hipótese de deterioração do sistema imunológico pode ser reforçada pela associação encontrada no presente estudo entre a carga viral do EBV e a carga viral do HIV e o tempo de infecção por este retrovírus. Deste modo, pacientes que tiveram detectadas elevadas cargas virais para o EBV, também apresentavam altas cargas para o HIV, e maior era o tempo de infecção pelo HIV. Assim, tanto a elevação na carga do HIV quanto a prolongada exposição aos efeitos deste contribuem para a deterioração do sistema imunitário que favorece o aumento na carga viral do EBV, seja por reativação viral, resultando em replicação lítica do EBV ou pelo aumento no número de células latentemente infectadas^{57,60,79}.

Importante fato ressaltado por Piriou e colaboradores (2004) é de que a carga viral absoluta do EBV não é um rastreador para doenças associadas a este vírus. Os autores demonstram que após a soroconversão dos pacientes HIV-negativos em HIV-positivos houve uma elevação significativa na carga viral do EBV (de 205 para 1.002 cópias/ 10^6 PBMC), que não foi observada no período de 1 a 5 anos após a soroconversão. Portanto, informações clínico-epidemiológicas, principalmente contagem de linfócitos T CD₄⁺ e CD₈⁺ que indicam o adequado funcionamento do sistema imunitário devem ser conjuntamente avaliadas com a carga viral do EBV. Os autores ressaltam que elevada carga viral do EBV e níveis de linfócitos T CD₈⁺ suficientes para adequada resposta imunológica é a situação

normalmente encontrada em pacientes infectados pelo HIV⁶¹. No presente estudo foi encontrada relação direta entre carga viral do EBV e contagem de linfócitos T CD₈⁺, assim houve detecção de maior carga viral do EBV em pacientes que apresentavam maiores níveis de células T CD₈⁺. Já foi demonstrado que elevada carga viral do EBV pode ser sinônimo também de um prognóstico ruim em relação a resposta à HAART, visto que indivíduos sem tratamento que apresentam elevada carga viral do EBV possuem um atraso no aumento dos níveis de células T CD₄⁺ após início da terapia antirretroviral⁵⁹.

No presente estudo não houve associação significativa entre o estágio CDC e a carga viral detectada de EBV. Esse mesmo resultado foi encontrado por Dehee e colaboradores (2001) que analisaram 113 pacientes infectados pelo HIV, dos quais 13 eram estágio A da classificação CDC, 54 foram B, e 46 eram C. Além destes, 24 indivíduos soronegativos para HIV mas soropositivos assintomáticos para o EBV foram incluídos no estudo. No grupo controle a carga viral do EBV, detectável em 50% dos indivíduos, variou de 10 a 485 cópias/10⁶ PBMC. Já nos pacientes HIV-positivos foi possível a detecção viral em 51% dos pacientes, sendo a carga viral do EBV entre 10 a 52.074 cópias/10⁶ PBMC. A detecção e a carga viral do EBV não apresentaram correlação significativa com contagem de células T CD₄⁺ e CD₈⁺ ou com a viremia do HIV, assim como não tiveram associação com o grau de imunossupressão, o estágio CDC ou tipo de tratamento antiretroviral¹⁸.

Houve detecção de elevada carga viral do EBV em pacientes coinfectados com os EBVs dos tipos 1 e 2 (mediana 2,09x10⁻² cópia de EBV/célula) no presente estudo. O segmento do gene EBNA-2 empregado na genotipagem viral foi amplificado com sucesso em 95/123 (77,2%) dos casos com carga viral detectável. Os genótipos foram distribuídos da seguinte forma: EBV-1 em 72 (75,8%) dos casos, EBV-2 em 9 (9,5%) e a coinfeção entre EBV-1 e 2 em 14 (14,7%) dos casos. O EBV-1 esteve presente no maior número de casos avaliados, o que está em sintonia com a literatura, pois o EBV-1 predomina em países ocidentais, enquanto ambos, EBV-1 e EBV-2, podem ser encontrados em países da África Equatorial e Nova Guiana⁸².

Fatores geográficos e étnicos podem influenciar a distribuição dos genótipos 1 e 2 do EBV em populações humanas, modificando a frequência de detecção desses genótipos virais nas doenças associadas ao EBV⁹⁶. Em estudo analisando EBNA-2 e EBNA-3C em 48 indivíduos hemofílicos portadores do HIV,

Yao e colaboradores (1998) relataram que EBV-2 é relativamente raro na população caucasiana, embora mostre tendência a se tornar endêmico entre indivíduos homossexuais⁹⁴. Também analisando EBNA-3c, Triantos e colaboradores (1998) analisaram os genótipos de EBV em 14 indivíduos HIV-positivos. Os autores descrevem que EBV-1 foi encontrado em 50%, EBV-2 em 28,5% e coinfecção de 1 e 2 em 21,5% dos casos. Destaca-se que indivíduos HIV-positivos possuem probabilidade 10 vezes maior de apresentarem anticorpos contra EBV tipo 2 quando comparados aos doadores de sangue⁸.

Em nossa casuística, composta essencialmente de indivíduos declarados heterossexuais (70,5%), houve maior número de coinfeções EBV-1 e EBV-2 em comparação aos casos de infecção somente pelo EBV-2. Há predominância do genótipo 2 do EBV entre homens homossexuais infectados pelo HIV-1, quando comparados com homossexuais sem a infecção retroviral e entre homens homossexuais em relação aos heterossexuais, ambos sem infecção pelo HIV⁸⁸. Por outro lado, Telenti e colaboradores (1993) relataram alta frequência de EBV-1 em uma coorte de pacientes portadores do HIV majoritariamente constituída de homens homossexuais. Os autores encontraram EBV-1 e EBV-2 em 84% (65/77) e em 21% (16/77) dos casos, respectivamente; 14/16 (87,5%) casos que apresentaram EBV-2 exibiam também infecção por EBV-1⁸¹.

Estudo de van Baarle e colaboradores (1999) analisou diferentes genótipos do EBV em indivíduos HIV-positivos pertencentes a três grupos: 1) pacientes com NHL (n = 30), 2) em progressão para aids sem linfomas (n = 42), e 3) assintomáticos de longo termo (n=18). Houve alta prevalência de EBV-2 em todos os grupos sendo 53% no primeiro grupo, 62% no segundo e 50% no terceiro. A coinfecção entre EBVs 1 e 2 foi detectada em 47%, 40% e 24% dos grupos 1, 2 e 3 respectivamente⁸⁹.

Predominância de coinfecção pelos genótipos 1 e 2 do EBV encontrados no presente estudo em relação ao genótipo 2 do EBV também foram descritos por Yao e colaboradores (1996), que analisaram uma coorte caracterizada predominantemente por caucasianos e homossexuais, dos quais 70% apresentavam sintomas de aids. Os autores descrevem presença do EBV-1 em 17/35 (48,5), EBV-2 1/35 (2,9%), infecções por múltiplas variantes de EBV-1 em 7/35 (20,0%) e por EBV-2 em 1/35 (2,9%); a coinfecção EBV-1 e EBV-2 foi verificada em 9/35 (25,7%) indivíduos. A presença de infecções múltiplas, seja com vírus de genótipos

diferentes ou variantes de um mesmo genótipo viral, foi observada frequentemente em indivíduos com imunossupressão causada pelo HIV⁹⁵.

Resultados similares foram encontrados por Correa e colaboradores (2007), que analisaram 144 pacientes HIV-positivos, dos quais 7 apresentavam linfoma primário do sistema nervoso central associado a aids, e 75 indivíduos HIV-negativos. Os autores relatam presença de EBV-1 em 48,6%, EBV-2 em 18,8% e coinfecção de EBV-1 e 2 em 32,6% dos casos HIV-positivos. No grupo controle o EBV-1 foi encontrado em 74,3%, o EBV-2 em 12,4% e a coinfecção dos EBVs 1 e 2 em 13,3%. Neste mesmo estudo, também foi avaliada a presença de deleção em BNLF-1, que foi encontrada em 44,4% dos casos HIV-positivos, dos quais 20,7% apresentavam apenas a versão com deleção, e 23,7% apresentavam coinfecção entre as variantes com e sem deleção. Já no grupo controle 25,3% apresentavam a versão deletada, dos quais 6,3% possuía apenas a forma com deleção, enquanto 19,0% apresentava coinfecção de ambas as variantes de BNLF-1¹³.

No presente estudo a amplificação do segmento do gene BNLF-1 para caracterização da deleção de 30pb foi possível em 99/123 (80,5%) pacientes. A detecção feita por *nested*-PCR revelou que 49/99 (49,5%) apresentavam a deleção de 30pb em BNLF-1, enquanto que 50/99 (50,5%) possuíam a versão sem deleção. Não houve diferença estatística significativa das variantes de BNLF-1 em relação aos dados clínicos-epidemiológicos levantados dos prontuários dos pacientes, assim como com a carga viral e genotipagem do EBV. Dados semelhantes foram encontrados por Berger e colaboradores (1999) que acompanharam 17 indivíduos desde a soro-conversão à HIV-positivos até o momento do diagnóstico de aids, quando foi encontrada a versão de BNLF-1 com deleção em 7 (41,2%) indivíduos, enquanto 6 (35,3%) apresentavam a versão não-deletada e 2 (11,8%) pacientes apresentavam ambas versões de BNLF-1.

Indivíduos imunocomprometidos possuem maior risco de desenvolver linfomas associados ao EBV³⁰, de modo que a determinação da carga viral deste em sangue periférico pode ter importância na evolução clínica de indivíduos portadores do HIV. A compilação dos resultados encontrados no presente estudo permite concluir que a exaustão do sistema imunitário causada pela elevação da carga viral do HIV, como nos casos de falha na terapia antirretroviral, juntamente com o longo período de infecção deste retrovírus propicia ambiente favorável à replicação do EBV, ainda que sejam mantidos ou estejam elevados os níveis de linfócitos T CD₈⁺.

Portanto, o monitoramento da carga viral do EBV ao longo do tempo de infecção pelo HIV possui importante valor prognóstico para doenças associadas ao EBV, desde que estes dados sejam analisados juntamente com informações clínico-epidemiológicas dos pacientes.

7 Conclusões

- Houve predominância na detecção do EBV-1, fato que pode estar relacionado com a coorte ser constituída predominantemente por indivíduos caucasianos e heterossexuais. A coinfecção dos EBVs tipos 1 e 2 foi encontrada mais frequentemente que a infecção por EBV-2, visto que múltiplas infecção não são raras em pacientes infectados pelo HIV.
 - Indivíduos coinfectados pelos tipos 1 e 2 do EBV apresentavam classificação CDC referente à contagem de células T CD_4^+ entre 200 e 499/ μ L de sangue, enquanto pacientes com infecção pelo EBV-1 ou EBV-2 tinham contagem inferior a 200 linfócitos T CD_4^+ / μ L de sangue.
 - A carga viral do EBV esteve diretamente relacionada com elevada viremia e longo tempo de infecção do HIV, altos níveis de células T CD_8^+ , falha na terapia antirretroviral e coinfecção dos tipos 1 e 2 do EBV. Esses fatores juntos podem indicar que embora a contagem de linfócitos T CD_8^+ tenha sido mantida, houve deterioração do sistema imunitário criando ambiente propício para replicação do EBV.
-

8 Referências Bibliográficas

1. AMON, W. & FARRELL, P. J. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. **Rev Med Virol**, v.15, n.3 p.149-56. 2005.
 2. ARRAND, J. R., RYMO, L., WALSH, J. E., BJORCK, E., LINDAHL, T. & GRIFFIN, B. E. Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. **Nucleic Acids Res**, v.9, n.13 p.2999-3014. 1981.
 3. AYADI, W., FEKI, L., KHABIR, A., BOUDAWARA, T., GHORBEL, A., CHARFEDDINE, I., DAOUD, J., FRIKHA, M., HAMMAMI, A. & KARRAY-HAKIM, H. Polymorphism analysis of Epstein-Barr virus isolates of nasopharyngeal carcinoma biopsies from Tunisian patients. **Virus Genes**, v.34, n.2 p.137-145. 2007.
 4. BADLEY, A. D. In vitro and in vivo effects of HIV protease inhibitors on apoptosis. **Cell Death Differ**, v.12 Suppl 1 p.924-931. 2005.
 5. BELLOWS, D. S., HOWELL, M., PEARSON, C., HAZLEWOOD, S. A. & HARDWICK, J. M. Epstein-Barr virus BALF1 is a BCL-2-like antagonist of the herpesvirus antiapoptotic BCL-2 proteins. **J Virol**, v.76, n.5 p.2469-2479. 2002.
 6. BESSON, C., GOUBAR, A., GABARRE, J., ROZENBAUM, W., PIALOUX, G., CHATELET, F. P., KATLAMA, C., CHARLOTTE, F., DUPONT, B., BROUSSE, N., HUERRE, M., MIKOL, J., CAMPARO, P., MOKHTARI, K., TULLIEZ, M., SALMON-CERON, D., BOUE, F., COSTAGLIOLA, D. & RAPHAEL, M. Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly active antiretroviral therapy. **Blood**, v.98, n.8 p.2339-2344. 2001.
 7. BIGGAR, R. J., JAFFE, E. S., GOEDERT, J. J., CHATURVEDI, A., PFEIFFER, R. & ENGELS, E. A. Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. **Blood**, v.108, n.12 p.3786-3791. 2006.
 8. BUISSON, M., MORAND, P., GENOULAZ, O., BOURGEAT, M. J., MICOUD, M. & SEIGNEURIN, J. M. Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. **J Gen Virol**, v.75 (Pt 2) p.431-7. 1994.
 9. CARBONE, A., CESARMAN, E., SPINA, M., GLOGHINI, A. & SCHULZ, T. F. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. **Blood**, v.113, n.6 p.1213-24. 2009.
 10. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, C. D. C. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among asolescentes and adults. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.41 p.RR-17. 1992.
-

11. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, C. D. C. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. 1981. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.45, n.34 p.729-733. 1996.
12. CESARMAN, E. & KNOWLES, D. M. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases. **Semin Cancer Biol**, v.9, n.3 p.165-174. 1999.
13. CORREA, R. M., FELLNER, M. D., DURAND, K., REDINI, L., ALONIO, V., YAMPOLSKY, C., COLOBRARO, A., SEVLEVER, G., TEYSSIE, A., BENETUCCI, J. & PICCONI, M. A. Epstein Barr virus genotypes and LMP-1 variants in HIV-infected patients. **J Med Virol**, v.79, n.4 p.401-7. 2007.
14. CRAWFORD, D. H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.356, n.1408 p.461-473. 2001.
15. CULLEN, B. R. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. **Cell**, v.93, n.5 p.685-692. 1998.
16. DA SILVA, G. N., BACCHI, M. M., RAINHO, C. A. & DE OLIVEIRA, D. E. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. **Arch Pathol Lab Med**, v.131, n.11 p.1691-1696. 2007.
17. DE OLIVEIRA, D. E., BACCHI, M. M., MACARENCO, R. S., TAGLIARINI, J. V., CORDEIRO, R. C. & BACCHI, C. E. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. **Am J Clin Pathol**, v.126, n.2 p.284-93. 2006.
18. DEHEE, A., ASSELOT, C., PIOLOT, T., JACOMET, C., ROZENBAUM, W., VIDAUD, M., GARBARG-CHENON, A. & NICOLAS, J. C. Quantification of Epstein-Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. **J Med Virol**, v.65, n.3 p.543-52. 2001.
19. DIAMOND, C., TAYLOR, T. H., ABOUMRAD, T. & ANTON-CULVER, H. Changes in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy: incidence, presentation, treatment, and survival. **Cancer**, v.106, n.1 p.128-135. 2006.
20. DOLAN, A., ADDISON, C., GATHERER, D., DAVISON, A. J. & MCGEOCH, D. J. The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876. **Virology**, v.350, n.1 p.164-170. 2006.
21. ELIOPOULOS, A. G. & YOUNG, L. S. LMP1 structure and signal transduction. **Semin Cancer Biol**, v.11, n.6 p.435-444. 2001.

22. FAN, H., KIM, S. C., CHIMA, C. O., ISRAEL, B. F., LAWLESS, K. M., EAGAN, P. A., ELMORE, S., MOORE, D. T., SCHICHMAN, S. A., SWINNEN, L. J. & GULLEY, M. L. Epstein-Barr viral load as a marker of lymphoma in AIDS patients. **J Med Virol**, v.75, n.1 p.59-69. 2005.
23. FARRELL, P. J., CLUDTS, I. & STUHLER, A. Epstein-Barr virus genes and cancer cells. **Biomed Pharmacother**, v.51, n.6-7 p.258-267. 1997.
24. FAUCI, A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. **Nature**, v.384, n.6609 p.529-534. 1996.
25. FEIGAL, E. G. AIDS-associated malignancies: research perspectives. **Biochim Biophys Acta**, v.1423, n.1 p.C1-C9. 1999.
26. FIELDING, C. A., SANDVEJ, K., MEHL, A., BRENNAN, P., JONES, M. & ROWE, M. Epstein-Barr virus LMP-1 natural sequence variants differ in their potential to activate cellular signaling pathways. **J Virol**, v.75, n.19 p.9129-9141. 2001.
27. FISCHER, N., KOPPER, B., GRAF, N., SCHLEHOFER, J. R., GRASSER, F. A. & MUELLER-LANTZSCH, N. Functional analysis of different LMP1 proteins isolated from Epstein-Barr virus-positive carriers. **Virus Res**, v.60, n.1 p.41-54. 1999.
28. GOEDERT, J. J. The epidemiology of acquired immunodeficiency syndrome malignancies. **Semin Oncol**, v.27, n.4 p.390-401. 2000.
29. GOTTLIEB, M. S. AIDS--past and future. **N Engl J Med**, v.344, n.23 p.1788-1791. 2001.
30. GROGG, K. L., MILLER, R. F. & DOGAN, A. HIV infection and lymphoma. **J Clin Pathol**, v.60, n.12 p.1365-1372. 2007.
31. GRUHNE, B., SOMPALLAE, R., MARESCOTTI, D., KAMRANVAR, S. A., GASTALDELLO, S. & MASUCCI, M. G. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.7 p.2313-8. 2009.
32. GRUHNE, B., SOMPALLAE, R. & MASUCCI, M. G. Three Epstein-Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints. **Oncogene**, v.28, n.45 p.3997-4008. 2009.
33. GRULICH, A. E., LI, Y., MCDONALD, A. M., CORRELL, P. K., LAW, M. G. & KALDOR, J. M. Decreasing rates of Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in the era of potent combination anti-retroviral therapy. **AIDS**, v.15, n.5 p.629-633. 2001.

34. HAKIM, H., GIBSON, C., PAN, J., SRIVASTAVA, K., GU, Z., BANKOWSKI, M. J. & HAYDEN, R. T. Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. **J Clin Microbiol**, v.45, n.7 p.2151-2155. 2007.
35. HASSAN, R., WHITE, L. R., STEFANOFF, C. G., DE OLIVEIRA, D. E., FELISBINO, F. E., KLUMB, C. E., BACCHI, C. E., SEUANEZ, H. N. & ZALCBERG, I. R. Epstein-Barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. **Diagn Pathol**, v.1 p.17. 2006.
36. HU, L. F., ZABAROVSKY, E. R., CHEN, F., CAO, S. L., ERNBERG, I., KLEIN, G. & WINBERG, G. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. **J Gen Virol**, v.72 p.2399-2409. 1991.
37. HUDNALL, S. D., CHEN, T., ALLISON, P., TYRING, S. K. & HEATH, A. Herpesvirus prevalence and viral load in healthy blood donors by quantitative real-time polymerase chain reaction. **Transfusion**, v.48, n.6 p.1180-7. 2008.
38. INTERNATIONAL COLLABORATION ON HIV AND CANCER. Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. **J Natl Cancer Inst**, v.92, n.22 p.1823-1830. 2000.
39. JOHNSON, R. J., STACK, M., HAZLEWOOD, S. A., JONES, M., BLACKMORE, C. G., HU, L. F. & ROWE, M. The 30-base-pair deletion in Chinese variants of the Epstein-Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. **J Virol**, v.72, n.5 p.4038-4048. 1998.
40. JONCAS, J., BOUCHER, J., GRANGER-JULIEN, M. & FILION, C. Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. **Can Med Assoc J**, v.110, n.1 p.33-37. 1974.
41. KANEGANE, H., NOMURA, K., MIYAWAKI, T. & TOSATO, G. Biological aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes in chronic active EBV infection and associated malignancies. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.44, n.3 p.239-249. 2002.
42. KIM, H. S., YI, J. M., HIRAI, H., HUH, J. W., JEONG, M. S., JANG, S. B., KIM, C. G., SAITOU, N., HYUN, B. H. & LEE, W. H. Human Endogenous Retrovirus (HERV)-R family in primates: Chromosomal location, gene expression, and evolution. **Gene**, v.370 p.34-42. 2006.
43. KIMURA, H., ITO, Y., SUZUKI, R. & NISHIYAMA, Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. **Rev Med Virol**, v.18 p.305-319. 2008.

44. KLUMB, C. E., HASSAN, R., DE OLIVEIRA, D. E., DE RESENDE, L. M., CARRICO, M. K., DE ALMEIDA DOBBIN, J., POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S., BACCHI, C. E. & MAIA, R. C. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. **Int J Cancer**, v.108, n.1 p.66-70. 2004.
45. KUPPERS, R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. **Nat Rev Immunol**, v.3, n.10 p.801-812. 2003.
46. LEDERGERBER, B., TELENTI, A. & EGGER, M. Risk of HIV related Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma with potent antiretroviral therapy: prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. **BMJ**, v.319, n.7201 p.23-24. 1999.
47. LEVER, A. M. & JEANG, K. T. Replication of human immunodeficiency virus type 1 from entry to exit. **Int J Hematol**, v.84, n.1 p.23-30. 2006.
48. LEVY, J. A. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. **Adv Dent Res**, v.19, n.1 p.10-16. 2006.
49. LIN, J. C., LIN, S. C., DE, B. K., CHAN, W. P., EVATT, B. L. & CHAN, W. C. Precision of genotyping of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction using three gene loci (EBNA-2, EBNA-3C, and EBER): predominance of type A virus associated with Hodgkin's disease. **Blood**, v.81, n.12 p.3372-3381. 1993.
50. LING, P. D., VILCHEZ, R. A., KEITEL, W. A., POSTON, D. G., PENG, R. S., WHITE, Z. S., VISNEGARWALA, F., LEWIS, D. E. & BUTEL, J. S. Epstein-Barr virus DNA loads in adult human immunodeficiency virus type 1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. **Clin Infect Dis**, v.37, n.9 p.1244-1249. 2003.
51. MALUMBRES, M. & BARBACID, M. Cell cycle kinases in cancer. **Curr Opin Genet Dev**, v.17, n.1 p.60-5. 2007.
52. MARTELIUS, T., LAPPALAINEN, M., AALTO, S. M., NIHTINEN, A., HEDMAN, K. & ANTTILA, V. J. Clinical characteristics, outcome and the role of viral load in nontransplant patients with Epstein-Barr viraemia. **Clin Microbiol Infect**, v. [Epub ahead of print]. 2009.
53. MCCLAIN, K. L. Epstein-Barr virus and HIV-AIDS-associated diseases. **Biomed Pharmacother**, v.55, n.7 p.348-352. 2001.
54. MELLORS, J. W., KINGSLEY, L. A., RINALDO, C. R., JR., TODD, J. A., HOO, B. S., KOKKA, R. P. & GUPTA, P. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. **Ann Intern Med**, v.122, n.8 p.573-9. 1995.

55. MOK, C. C., LANCHBURY, J. S., CHAN, D. W. & LAU, C. S. Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.41, n.6 p.1090-5. 1998.
56. MUSACCHIO, A. & SALMON, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.5 p.379-93. 2007.
57. O'SULLIVAN, C. E., PENG, R., COLE, K. S., MONTELARO, R. C., STURGEON, T., JENSON, H. B. & LING, P. D. Epstein-Barr virus and human immunodeficiency virus serological responses and viral burdens in HIV-infected patients treated with HAART. **J Med Virol**, v.67, n.3 p.320-326. 2002.
58. OKIE, S. Fighting HIV—lessons from Brazil. **N Engl J Med**, v.354, n.19 p.1977-1981. 2006.
59. PANAGIOTAKIS, S. H., SOUFLA, G., BARITAKI, S., SOURVINOS, G., PASSAM, A., ZAGOREOS, I., STAVRIANEAS, N. & SPANDIDOS, D. A. Concurrent CMV and EBV DNAemia is significantly correlated with a delay in the response to HAART in treatment-naïve HIV type 1-positive patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.23, n.1 p.10-8. 2007.
60. PIRIOU, E., JANSEN, C. A., VAN DORT, K., DE CUYPER, I., NANLOHY, N. M., LANGE, J. M., VAN OERS, M. H., MIEDEMA, F. & VAN BAARLE, D. Reconstitution of EBV latent but not lytic antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells after HIV treatment with highly active antiretroviral therapy. **J Immunol**, v.175, n.3 p.2010-2017. 2005.
61. PIRIOU, E. R., VAN DORT, K., NANLOHY, N. M., MIEDEMA, F., VAN OERS, M. H. & VAN BAARLE, D. Altered EBV viral load setpoint after HIV seroconversion is in accordance with lack of predictive value of EBV load for the occurrence of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. **J Immunol**, v.172, n.11 p.6931-7. 2004.
62. PLENTZ, A., JILG, W., KOCHANOWSKI, B., IBACH, B. & KNOLL, A. Detection of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid and correlation with clinical symptoms. **Infection**, v.36, n.2 p.158-62. 2008.
63. POMERANTZ, R. J. & HORN, D. L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. **Nat Med**, v.9, n.7 p.867-73. 2003.
64. PORTIS, T., DYCK, P. & LONGNECKER, R. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. **Blood**, v.102, n.12 p.4166-78. 2003.
65. RABKIN, C. S. AIDS and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART). **Eur J Cancer**, v.37, n.10 p.1316-1319. 2001.

66. REEVES, J. D. & DOMS, R. W. Human immunodeficiency virus type 2. **J Gen Virol**, v.83, n.Pt 6 p.1253-1265. 2002.
67. REZK, S. A. & WEISS, L. M. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. **Hum Pathol**, v.38, n.9 p.1293-1304. 2007.
68. ROTHENBERGER, S., BACHMANN, E., BERGER, C., MCQUAIN, C., ODERMATT, B. F. & KNECHT, H. Natural 30 base pair and 69 base pair deletion variants of the LMP1 oncogene do stimulate NF-kappaB-mediated transcription. **Oncogene**, v.14, n.17 p.2123-2126. 1997.
69. RYAN, J. L., MORGAN, D., DOMINGUES, R., THORNE, L., ELMORE, S., MINO-KENUDSON, M., LAUWERS, G., BOOKER, J. & GULLEY, M. High levels of Epstein-Barr virus DNA in latently infected gastrics adenocarcinoma. **Lab Investigation** v.89 p.80-90. 2009.
70. SAMPLE, J., YOUNG, L., MARTIN, B., CHATMAN, T., KIEFF, E., RICKINSON, A. & KIEFF, E. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. **J Virol**, v.64, n.9 p.4084-4092. 1990.
71. SANDVEJ, K., PEH, S. C., ANDRESEN, B. S. & PALLESEN, G. Identification of potential hot spots in the carboxy-terminal part of the Epstein-Barr virus (EBV) BNLF-1 gene in both malignant and benign EBV-associated diseases: high frequency of a 30-bp deletion in Malaysian and Danish peripheral T-cell lymphomas. **Blood**, v.84, n.12 p.4053-4060. 1994.
72. SCHUBERT, U., ANTON, L. C., GIBBS, J., NORBURY, C. C., YEWDELL, J. W. & BENNINK, J. R. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. **Nature**, v.404, n.6779 p.770-774. 2000.
73. SCHULZ, T. F. & CORDES, S. Is the Epstein-Barr virus EBNA-1 protein an oncogen? **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n.7 p.2091-2. 2009.
74. SHAPIRO, M., DUCA, K. A., LEE, K., DELGADO-ECKERT, E., HAWKINS, J., JARRAH, A. S., LAUBENBACHER, R., POLYS, N. F., HADINOTO, V. & THORLEY-LAWSON, D. A. A virtual look at Epstein-Barr virus infection: simulation mechanism. **J Theor Biol**, v.252, n.4 p.633-648. 2008.
75. SHARIPO, A., IMREH, M., LEONCHIKS, A., IMREH, S. & MASUCCI, M. G. A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I kappaB alpha with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis. **Nat Med**, v.4, n.8 p.939-944. 1998.
76. SILVERBERG, M. J. & ABRAMS, D. I. AIDS-defining and non-AIDS-defining malignancies: cancer occurrence in the antiretroviral therapy era. **Curr Opin Oncol**, v.19, n.5 p.446-451. 2007.

-
77. SIMON, V., HO, D. D. & ABDOOL KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v.368, n.9534 p.489-504. 2006.
78. STEBBING, J., GAZZARD, B. & DOUEK, D. C. Where does HIV live? **N Engl J Med**, v.350, n.18 p.1872-1880. 2004.
79. STEVENS, S. J., BLANK, B. S., SMITS, P. H., MEENHORST, P. L. & MIDDELDORP, J. M. High Epstein-Barr virus (EBV) DNA loads in HIV-infected patients: correlation with antiretroviral therapy and quantitative EBV serology. **AIDS**, v.16, n.7 p.993-1001. 2002.
80. TAKADA, K. & NANBO, A. The role of EBERs in oncogenesis. **Semin Cancer Biol**, v.11, n.6 p.461-467. 2001.
81. TELENTI, A., UEHLINGER, D. E., MARCHESI, F., GERMANN, D., MALINVERNI, R. & MATTER, L. Epstein-Barr virus infection in HIV-positive patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.12, n.8 p.601-9. 1993.
82. THOMPSON, M. P. & KURZROCK, R. Epstein-Barr virus and cancer. **Clin Cancer Res**, v.10, n.3 p.803-821. 2004.
83. THORLEY-LAWSON, D. A. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? **J Allergy Clin Immunol**, v.116, n.2 p.251-261. 2005.
84. THORLEY-LAWSON, D. A. & BABCOCK, G. J. A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. **Life Sci**, v.65, n.14 p.1433-1453. 1999.
85. THORLEY-LAWSON, D. A. & GROSS, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. **N Engl J Med**, v.350, n.13 p.1328-1337. 2004.
86. UCHIDA, J., YASUI, T., TAKAOKA-SHICHIJO, Y., MURAOKA, M., KULWICHIT, W., RAAB-TRAUB, N. & KIKUTANI, H. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. **Science**, v.286, n.5438 p.300-303. 1999.
87. UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update December 2007. **UNAIDS, Geneva 2007. UNAIDS/07.27E/JC1322. E ISBN 978 92 9 173621 8.**
88. VAN BAARLE, D., HOVENKAMP, E., DUKERS, N. H., RENWICK, N., KERSTEN, M. J., GOUDSMIT, J., COUTINHO, R. A., MIEDEMA, F. & VAN OERS, M. H. High prevalence of Epstein-Barr virus type 2 among homosexual men is caused by sexual transmission. **J Infect Dis**, v.181, n.6 p.2045-2049. 2000.
-

89. VAN BAARLE, D., HOVENKAMP, E., KERSTEN, M. J., KLEIN, M. R., MIEDEMA, F. & VAN OERS, M. H. Direct Epstein-Barr virus (EBV) typing on peripheral blood mononuclear cells: no association between EBV type 2 infection or superinfection and the development of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. **Blood**, v.93, n.11 p.3949-3955. 1999.
90. WEISS, R. A. Getting to know HIV. **Trop Med Int Health**, v.5, n.7 p.A10-A5. 2000.
91. WILDE, J. T., LEE, C. A., DARBY, S. C., KAN, S. W., GIANGRANDE, P., PHILLIPS, A. N., WINTER, M., SPOONER, R. & LUDLAM, C. A. The incidence of lymphoma in the UK haemophilia population between 1978 and 1999. **Aids**, v.16, n.13 p.1803-1807. 2002.
92. WILLIAMS, H. & CRAWFORD, D. H. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. **Blood**, v.107, n.3 p.862-869. 2006.
93. WOOD, C. & HARRINGTON, W., JR. AIDS and associated malignancies. **Cell Res**, v.15, n.11-12 p.947-952. 2005.
94. YAO, Q. Y., CROOM-CARTER, D. S., TIERNEY, R. J., HABESHAW, G., WILDE, J. T., HILL, F. G., CONLON, C. & RICKINSON, A. B. Epidemiology of infection with Epstein-Barr virus types 1 and 2: lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. **J Virol**, v.72, n.5 p.4352-63. 1998.
95. YAO, Q. Y., TIERNEY, R. J., CROOM-CARTER, D., DUKERS, D., COOPER, G. M., ELLIS, C. J., ROWE, M. & RICKINSON, A. B. Frequency of multiple Epstein-Barr virus infections in T-cell-immunocompromised individuals. **J Virol**, v.70, n.8 p.4884-94. 1996.
96. YOUNG, L. S., DAWSON, C. W. & ELIOPOULOS, A. G. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. **Mol Pathol**, v.53, n.5 p.238-247. 2000.
97. YOUNG, L. S. & RICKINSON, A. B. Epstein-Barr virus: 40 years on. **Nat Rev Cancer**, v.4, n.10 p.757-768. 2004.
98. YUAN, C. C., MILEY, W. & WATERS, D. A quantification of human cells using an ERV-3 real time PCR assay. **J Virol Methods**, v.91, n.2 p.109-17. 2001.
99. ZHU, T., KORBER, B. T., NAHMIAS, A. J., HOOPER, E., SHARP, P. M. & HO, D. D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. **Nature**, v.391, n.6667 p.594-597. 1998.