PAULO HENRIQUE BRAZ-SILVA

**RECRUTAMENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS IMATURAS E
LINFÓCITOS T REGULADORES (T_{reg}) EM LESÕES ASSOCIADAS
AO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV): PAPEL DA CITOCINA MIP3 α**

São Paulo

2009

Paulo Henrique Braz-Silva

**Recrutamento de células dendríticas imaturas e linfócitos T
reguladores (T reg) em lesões associadas ao vírus Epstein-Barr
(EBV): papel da citocina MIP3 α**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadores: Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães e Prof. Dr. Alain Doglio

São Paulo
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Braz-Silva PH. Recrutamento de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores (T reg) em lesões associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV): papel da citocina MIP3 α [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe Juraci. Obrigado por estar sempre ao meu lado, pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões, por não deixar que eu desanimasse jamais! Obrigado por me permitir ter chegado até aqui, sem você nada disso teria sido possível. Te amo muito!!!

Ao Silvan, pelo apoio e incentivo em todos os momentos! Sem você ao meu lado não teria conseguido dar esse passo tão importante. Obrigado pelo companheirismo e compreensão. Te amo muito!!!

À minha irmã Juliana e minha sobrinha Maria Eduarda. Vocês são as mulheres da minha vida! Amo vocês!!!

Ao meu anjo da guarda na França, minha amiga-irmã Vera Martinez. Em palavras não conseguiria dizer o que você significa para mim. Você é a grande responsável pelo sucesso do meu período na França. Te amo!!!

À minha amiga-irmã francesa Céline Loubatier. Não consigo me imaginar sem a sua amizade. Sua generosidade comigo pelo período que estivemos juntos é algo que nunca vou conseguir agradecer. Muita saudade!!!! Te amo!!!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora no Brasil Profa. Dra. Marina Magalhães. Obrigado por toda confiança e paciência comigo durante toda essa jornada, me orientando desde a iniciação científica. Obrigado pela confiança e pela liberdade com que sempre trabalhei. As oportunidades que tive durante todo esse período devo a você. Muitíssimo obrigado!!! Ser seu orientado foi um grande presente.

Ao meu orientador na França Prof. Dr. Alain Doglio. Agradeço por ter me recebido tão bem quando cheguei à França. Obrigado pelo incentivo, atenção, correções e apoio durante a realização deste trabalho. Seu entusiasmo e dedicação à pesquisa são contagiantes. Agradeço por ter me acolhido tão bem em sua equipe e ter me orientado em todos os sentidos. Sua preocupação com o meu bem estar e qualidade de vida num país estrangeiro foi algo além da orientação acadêmica, mas sim de um verdadeiro amigo. Obrigado também por ter me apresentado esse país maravilhoso e surpreendente que é a França! Tenha certeza de que conseguiu um admirador incondicional da cultura francesa.

À Profa. Dra. Susana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, exemplo de dedicação e entusiasmo às causas do ensino e da pesquisa, pelo estímulo constante.

Ao Prof. Dr. Paul Hofman, professor titular de Patologia da Faculdade de Medicina, chefe de serviço do Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale e Thumorotèque do Hospital Pasteur, Université de Nice Sophia Antipolis. Muito obrigado pelo apoio desde o nosso primeiro contato no Congresso da Academia Internacional de Patologia em Montreal (IAP-2006). Por ter me recebido de portas abertas em seu serviço, pelo exemplo de dedicação e empenho a pesquisa que me servirão de exemplo durante toda minha carreira.

Ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo e à Profa. Dra. Vera Cavalcante de Araújo, os maiores exemplos da Patologia Bucal no Brasil.

À toda sociedade paulista, que através de seus impostos, investiu na minha formação na Universidade de São Paulo. Espero de alguma forma poder retribuir todo esse empenho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), agência de fomento imprescindível para a pós-graduação no Brasil. Obrigado pelo suporte financeiro, tanto no Brasil como na França.

Ao *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM) pelo apoio financeiro a este trabalho.

À toda sociedade francesa, na figura da associação *SIDACTION*, que através de seus donativos tornaram possíveis o financiamento de trabalhos científicos como este.

À Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, pela amizade e por todos os ensinamentos de imunoistoquímica. Suas correções e observações neste trabalho foram imprescindíveis, muito obrigado!

À Profa. Dra. Raimunda Telma de Macedo Santos, pela generosidade com que me abriu as portas da divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Seus ensinamentos de hibridização *in situ* foram primordiais para o sucesso deste trabalho. Foi uma grande honra trabalhar com uma das pioneiras da imunoistoquímica no Brasil.

A todos os professores do curso de pós-graduação da disciplina de Patologia Bucal, pelo acolhimento e pelos ensinamentos transmitidos de forma carinhosa e competente.

À toda equipe técnico-científica do Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale e Thumorotèque do Hospital Pasteur, Universidade de Nice Sophia Antipolis, que foram essenciais para a realização desse trabalho.

À Dra. Catherine Butori, médica patologista do Laboratoire de Pathologie Clinique Expérimentale, pela revisão das lâminas de linfomas de Hodgkin e carcinoma de nasofaringe.

À toda equipe técnico-científica da disciplina de Patologia Bucal. Obrigado Zilda, Néia, Nair, Patrícia, Elisa e Bia, pelo carinho e dedicação.

À secretária do serviço de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da USP Catia Tiezzi. Muito obrigado por ter acompanhado toda a parte burocrática de minha pós-graduação com tanto carinho e empenho.

Às professoras Iracema Gonzalez Losada, Maria Celina Corrêa Guerra e Silvia Voss Steinee, por toda paciência e dedicação bem no início da minha caminhada. Este trabalho é fruto do estímulo de vocês também. Muito obrigado!

A todos os meus professores de francês, na figura da Profa. Maria Sanchez Morassi e do Prof. Sérgio Cunha dos Santos, responsáveis por instigar uma verdadeira paixão por essa língua. Vocês foram essenciais no sucesso dessa minha jornada! Je vous remercie de tout mon coeur!!!

Ao meu “filho” Frederico, a coisinha mais fofa do mundo. Não tenho palavras para dizer quanto o amo.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Patologia Bucal da FOUSP, pelo convívio e pelas experiências que pudemos compartilhar.

À amiga Karen Renata Nakamura Hiraki, obrigado por tudo, você foi essencial nessa minha jornada. Agradeço pelos telefonemas infundáveis que me faziam sentir menos sozinho na França. Seu ombro amigo me fez seguir em frente. “Os amigos são irmãos que Deus nos permite escolher”. Agradeço a Ele todos os dias por essa nova irmã. Parabéns pelo concurso na Universidade Federal de Uberlândia, você merece tudo o que há de melhor no mundo. Te amo!

À amiga Thaís Acquafreda, obrigado pelo apoio e incentivo desde a graduação. Toda essa caminhada foi mais agradável por ser partilhada com você! Obrigado! Precisamos começar a pensar na sucessão da copa.

À amiga Natalie Pepe Medeiros de Rezende, pela amizade, ajuda e estímulo. Te adoro!!!

Aos amigos Fabiana Martins e Márcio Augusto de Oliveira. Adoro vocês, meus “afilhados”.

À amiga Juliana Schussel, pela amizade à primeira vista, pelas risadas, pelos momentos na copa, pela persistência no envio de trabalhos. Ser seu amigo é um grande privilégio! Apoio você para ser a próxima titular da copa.

À amiga Alexandra Fontes, pela amizade, pelos momentos *junk food* e pelos papos falando das peripécias do Caco e do Frederico. Adoro você!

A todos os meus amigos do Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale e Thumorotèque do Hospital Pasteur de Nice. Eric Selva, Richard Lavagna, Virginie Lespinet, Amel Dridi, Oliver Bordone, Pascal Grier, Olivier Carruggi, Céline Coëlle, Bénédict Brion e Stéphane Vallinas, vous me manquez trop fort!!!

À minha amiga Virginie Gavric Tanga, por ter me acolhido de forma maravilhosa desde quando cheguei à Thumorotèque. Obrigado por sua amizade sincera e por ter me ensinado todo funcionamento do laboratório. Sinto muita saudade das cócegas e das batalhas de rolo de papel! Je t'adore!!!

Ao amigo Sébastien Vitale, pela ajuda e companheirismo durante toda a realização deste trabalho. Ter trabalhado com você foi um grande privilégio! Sua competência e espírito científico me servem de exemplo.

À minha amiga Sylvie Colier e a pequena Ilana Colier. Não tenho palavras para agradecer todo o carinho e amizade com que você me recebeu em sua casa. Um brasileiro desconhecido que foi acolhido como um verdadeiro irmão. Não vou esquecer disso nunca. Você foi uma das maiores responsáveis pelos momentos maravilhosos que passei na França. De desconhecidos que dividiam apartamento a grandes amigos! Obrigado, muito obrigado por ter partilhado esses momentos comigo! À rainha e à princesa do Fontainebleau, minha eterna amizade e meu eterno agradecimento. Amo vocês!!!

Aos meus vizinhos em Nice Mme. Jacqueline Malgoire e M. Jean-Marc Excoffier, por terem me acolhido e recebido em suas vidas como um filho. A preocupação de vocês para comigo foi algo extremamente tocante, não esquecerei nunca. Saudade do foie gras e do poulet à la noix de coco.

À minha amiga Ilka Correa De Meo, por uma amizade que já dura mais de 10 anos. Obrigado por todos os momentos de confiança e por ter aguentado as minhas choradeiras pelo telefone. Sessões de *Friends*, pipoca e coca light com você são sempre boas demais.

Às minhas amigas Flávia Chammas e Mariana Minatel Braga. Obrigado por todo o companheirismo e amizade, ser amigo de vocês é um grande privilégio. Tenho um orgulho imenso de vocês!

À minha amiga Paula Ohara (Paulinha), sempre meu exemplo de competência e determinação. Ser seu amigo-irmão é um presente enorme. Te amo!!!

À minha amiga Maria Lúcia Ramos. Não vou falar em tempo de amizade pois entregaria nossa idade. Você é meu porto seguro, saber que posso contar com a sua amizade me faz mais forte. Obrigado por tudo! Te amo!!!

Ao meu amigo-irmão Aylton Custódio, pela amizade e companheirismo em todos os momentos. Ser seu amigo é um presentão de Deus. Obrigado! Te adoro!!!

Ao amigo Rodrigo Franco, obrigado pelos momentos de risos largos que você me proporcionou. A viagem pelo Sul da França no verão não seria a mesma sem você. Saudade de tomar kyr Royal no Café de Paris em Monte Carlo.

Ao amigo Ricardo Menino, pelo qual tenho um carinho enorme. Sua perspicácia e inteligência são contagiantes. Moinhos de vento!!! Te adoro!!!

À minha amiga Carolina Catelan. Quem diria que aquele semestre de francês renderia tanto? Foi amizade à primeira vista. Você é apaixonante!!! Obrigado por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos na França! Jamais vou esquecer o *reveillon au bord de la Seine*. Te adoro!!!

À minha amiga Joselma, por escutar minhas reclamações, aquelas que só pós-graduando bolsista entende. Muito obrigado pelas correções e observações feitas neste trabalho.

Agradeço a todos que, de alguma forma participaram da elaboração deste trabalho e colaboraram com ele e a todos aqueles que me ensinaram a prosseguir sempre.

O Tejo é mais belo

O Tejo é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia,
Mas o Tejo não é mais belo que o rio que corre pela minha aldeia
Porque o Tejo não é o rio que corre pela minha aldeia.

O Tejo tem grandes navios
E navega nele ainda,
Para aqueles que vêm em tudo o que lá não está,
A memória das naus.
O Tejo desce de Espanha
E o Tejo entra no mar em Portugal.
Toda a gente sabe isso.
Mas poucos sabem qual é o rio da minha aldeia
E para onde ele vai
E donde ele vem.
E por isso porque pertence a menos gente,
É mais livre e maior o rio da minha aldeia.

Pelo Tejo vai-se para o Mundo.
Para além do Tejo há a América
E a fortuna daqueles que a encontram.
Ninguém nunca pensou no que há para além
Do rio da minha aldeia.

O rio da minha aldeia não faz pensar em nada.
Quem está ao pé dele está só ao pé dele.

“O guardador de rebanhos” - Alberto Caeiro

Chapitre XXI

C'est alors qu'apparut le renard:

- Bonjour dit le renard.
- Bonjour, répondit poliment le petit prince, qui se retourna mais ne vit rien.
- Je suis là, dit la voix, sous le pommier...
- Qui es-tu? dit le petit prince. Tu es bien poli...
- Je suis un renard, dit le renard.
- Viens jouer avec moi, lui proposa le petit prince. Je suis tellement triste...
- Je ne puis pas jouer avec toi,
dit le renard. Je ne suis pas apprivoisé.
- Ah! pardon, fit le petit prince. Mais, après réflexion, il ajouta :
- Qu'est-ce que signifie "apprivoiser" ?
- Tu n'es pas d'ici, dit le renard, que cherches-tu?
- Je cherche les hommes, dit le petit prince. Qu'est-ce que signifie "apprivoiser" ?
- Les hommes, dit le renard, ils sont des fusils et ils chassent. C'est bien gênant ! Il élèvent aussi des poules. C'est leur seul intérêt. Tu cherches des poules?
- Non, dit le petit prince. Je cherche des amis. Qu'est-ce que signifie "apprivoiser"?
- C'est une chose trop oubliée, dit le renard. Ça signifie créer des liens...
- Créer des liens?
- Bien sûr, dit le renard. Tu n'es pas encore pour moi qu'un petit garçon tout semblable à cent mille petits garçons. Et je n'ai pas besoin de toi. Et tu n'as pas besoin de moi non plus. Je ne suis pour toi qu'un renard semblable à cent mille renards. Mais, si tu m'apprivoises, nous aurons besoin l'un de l'autre. Tu seras pour moi unique au monde. Je serai pour toi unique au monde...
- Je commence à comprendre, dit le petit prince.
- ../.

Ainsi le petit prince apprivoisa le renard. Et quand l'heure de départ fut proche :

- Ah! Dit le renard... Je pleurerai.
- C'est ta faute, dit le petit prince, je ne te souhaitais point de mal, mais tu as voulu que je t'apprivoise...
- Bien sûr, dit le renard.
- Mais tu vas pleurer! Dit le petit prince.
- Bien sûr, dit le renard. Va revoir les roses. Tu comprendras. Tu comprendras que la tienne est unique au monde. Tu reviendras me dire adieu, et je te ferai cadeau d'un secret.

Le petit prince s'en fut revoir les roses :

- Vous n'êtes pas du tout semblables à ma rose, vous n'êtes rien encore, leur dit-il. Personne ne vous a apprivoisées et vous n'avez apprivoisé personne. Vous êtes comme était mon renard. Ce n'était qu'un renard semblable à cent mille autres. Mais, j'en ai fait mon ami, et il est maintenant unique au monde. Et les roses étaient bien gênées. Vous êtes belles, mais vous êtes vides, leur dit-il encore. On ne peut pas mourir pour vous. Bien sûr, ma rose à moi, un passant ordinaire croirait qu'elle vous ressemble. Mais à elle seule elle est plus importante que vous toutes, puisque c'est elle que j'ai arrosée. Puisque c'est elle que j'ai mise sous globe. Puisque c'est elle que j'ai abritée par le paravent. Puisque c'est elle dont j'ai tué les chenilles (sauf les deux ou trois pour les papillons). Puisque c'est elle que j'ai écoutée se plaindre, ou se vanter, ou même quelquefois se taire. Puisque c'est ma rose.

Et il revient vers le renard :

- Adieu, dit-il...

- Adieu, dit le renard. Voici mon secret. Il est très simple:

- **On ne voit bien qu'avec le coeur.**

- **L'essentiel est invisible pour les yeux.**

- L'essentiel est invisible pour les yeux,
répéta le petit prince, afin de se souvenir.

- C'est le temps que tu as perdu pour ta rose qui fait ta rose si importante.

- C'est le temps que j'ai perdu pour ma rose...

fit le petit prince, afin de se souvenir.

- Les hommes ont oublié cette vérité, dit le renard. Mais tu ne dois pas l'oublier. **Tu deviens responsable pour toujours de ce que tu as apprivoisé.** Tu es responsable de ta rose...

- Je suis responsable de ma rose...

répéta le petit prince, afin de se souvenir.

"Le Petit Prince" - Antoine de Saint-Exupéry

Braz-Silva PH. Recrutamento de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores (T reg) em lesões associadas ao vírus Epstein-Barr (EBV): papel da citocina MIP3 α [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

O vírus Epstein-Barr infecta aproximadamente 95% da população mundial adulta, estabelecendo uma infecção latente e assintomática. Porém, é um vírus associado à neoplasias malignas, tais como carcinomas de nasofaringe, linfomas de Hodgkin, alguns casos de carcinomas gástrico, linfomas T e NK, dentre outras. O EBV também está implicado em doenças não neoplásicas como a leucoplasia pilosa. O fenômeno de imunotolerância está ligado ao potencial de infecção e oncogênico do EBV. Células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores são importantes nesse contexto. Em situações neoplásicas, esse mecanismo impede o reconhecimento e a destruição de células tumorais. O objetivo desse trabalho foi estudar em quatro diferentes situações de infecção pelo EBV, a saber, amigdalite crônica, linfomas de Hodgkin, leucoplasia pilosa e carcinomas de nasofaringe, a presença de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores, e também o papel da citocina MIP3 α no recrutamento dessas células. Foram utilizadas as técnicas de hibridização *in situ* para detecção do EBV e imunoistoquímica para detecção das células dendríticas, linfócitos T reg e para análise da expressão de MIP3 α . Em todos os casos de linfoma de Hodgkin, amigdalites e carcinomas de nasofaringe EBV+ observou-se uma forte concentração de células dendríticas imaturas e linfócitos T reg. A expressão de MIP3 α mostrou-se intensa nas neoplasias EBV positivas e fraca nos

casos de amigdalite crônica. Não foi observada expressão de MIP3 α nos casos de leucoplasia pilosa. A concentração de células dendríticas imaturas e linfócitos T reg está intimamente ligada à presença de células EBV+ e pela expressão de MIP3 α nos linfomas de Hodgkin associados ao EBV e carcinomas de nasofaringe, criando assim um micro-ambiente de imunossupressão nessas lesões.

Palavras-Chave: Epstein-Barr vírus (EBV), células dendríticas, linfócitos T reguladores (T reg), Proteína macrofágica inflamatória 3 α (MIP3 α), imunotolerância

Braz-Silva PH. Recruitment of immature dendritic cells and regulatory T cells (T reg) in Epstein-Barr (EBV) associated lesions: role of MIP3 α chemokine [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

The Epstein-Barr virus infects approximately 95% of adult world-wide population, establishing a latent and asymptomatic infection. However it is related to malignant neoplasia, such as nasopharynx carcinomas, Hodgkin disease, some gastric carcinomas, T/NK lymphomas among others. EBV is also implicated in non-neoplastic disease such as hairy leukoplakia. This phenomenon is associated with the EBV infectious and oncogenic potential. Immature dendritic cells and T reg cells are important in this context. In neoplastic situations, this mechanism obstructs recognition and destruction of tumoral cells. The aim of this work was study, in four different situations of EBV infection, to knowledge, chronic tonsillitis, Hodgkin's disease, hairy leukoplakia and nasopharynx carcinoma, the presence of immature dendritic cells and T reg cells, and also the role of cytokine MIP3 α in the recruitment of these cells. *In situ* hybridization was performed for EBV detection and immunohistochemistry for dendritic cells and T reg cells detection and also for expression evaluation of MIP3 α cytokine. In all the cases of Hodgkin's disease, tonsillitis and nasopharynx carcinoma EBV+, a strong concentration of immature dendritic cells and T reg lymphocytes was observed. The MIP3 α expression was more intense on EBV positive neoplasia and weak in cases of chronic tonsillitis. No MIP3 α expression was observed in hairy leukoplakia. The concentration of immature dendritic cell and T reg lymphocyte is intimately connected with the presence of EBV

positive-cells and MIP3 α expression in Hodgkin disease associated to EBV and nasopharynx carcinoma, creating a microenvironment of immunosuppression in these neoplasias.

Keywords: Epstein-Barr virus (EBV), dendritic cells, T reg lymphocyte (T reg), macrophage inflammatory protein 3 α (MIP3 α), immunotolerance

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
3 PROPOSIÇÃO	53
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) ou HHV-4 pertence à família dos vírus herpes humanos e infecta mais de 95% da população mundial adulta, o que mostra sua eficiência na sua transmissão e estabelecimento de uma infecção latente em indivíduos saudáveis (RICKINSON; KIEFF, 1996). O contágio pelo vírus se dá principalmente pela saliva, sendo que as tonsilas exercem um papel fundamental no estabelecimento da infecção latente do vírus em linfócitos B (HADINOTO et al., 2009).

O EBV está envolvido na patogênese de neoplasias malignas, tais como linfomas de Hodgkin, linfoma de Burkkit, carcinomas indiferenciados de nasofaringe, alguns casos de carcinomas gástricos e adenocarcinomas de mama, linfomas T e NK, desordens linfoproliferativas em pacientes transplantados, neoplasias malignas associadas ao HIV, dentre outras (CRAWFORD, 2001; THORLEY-LOWSON; GROSS, 2004; YOUNG; RICKINSON, 2004;). Está implicado também em doenças não neoplásicas como a mononucleose infecciosa, observada durante a primoinfecção sintomática do vírus, que ocorre sobretudo em adolescentes ou adultos jovens (HADINOTO et al., 2008), e também à leucoplasia pilosa, lesão que ocorre exclusivamente em pacientes imunossuprimidos, principalmente HIV positivos (BRAZ-SILVA et al., 2008).

Atualmente acumulam-se evidências de que o potencial oncogênico e de infecção do EBV esteja intimamente ligado à sua capacidade de escapar dos mecanismos de controle do sistema imunológico (BILLERBECK; THIMME, 2008). Para tanto, infecções virais, assim como neoplasias malignas, são capazes de criar microambientes imunossupressores, explorando um mecanismo fisiológico

denominado imunotolerância (BAUMFORTH et al., 2008; BILLERBECK; THIMME, 2008; GABRILOVICH, 2004; LAU et al., 2007; WINGATE et al., 2009; YIP et al., 2009).

Imunotolerância é um mecanismo fisiológico pelo qual o sistema imunológico se auto-regula, através da inibição de linfócitos TCD4 e TCD8, impedindo assim o desencadeamento da resposta imune. Este mecanismo atua inibindo o desenvolvimento de doenças auto-imunes, controlando e modulando inflamações crônicas (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Desempenham um papel central neste contexto células dendríticas imaturas (GABRILOVICH, 2004; BENNACEUR et al., 2009), linfócitos T reguladores (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; BAUMFORTH et al., 2008) e inúmeras citocinas imunossupressoras, tais como, IL-10 e MIP3 α (BAUMFORTH et al., 2008).

Células dendríticas são apresentadoras profissionais de antígenos, que são essenciais para o início da resposta imune. Porém, para que possam desempenhar este papel de estímulo de linfócitos, essas células precisam passar por um processo de maturação (GABRILOVICH, 2004; GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009). Quando permanecem em estágio imaturo, além de não conseguirem apresentar os antígenos de forma adequada, sabe-se atualmente que essas células possuem atividade imunossupressora, inibindo a ativação e atividade de linfócitos TCD4 e TCD8 e estimulando o recrutamento de linfócitos T reguladores, que também possuem atividades imunossupressoras (BENNACEUR et al., 2009; GABRILOVICH, 2004; MAHNKE; BEDKE; ENK, 2007).

Linfócitos T reguladores são linfócitos T especializados no controle da resposta imunológica, atuando no mecanismo de imunotolerância, inibindo a proliferação e atividade de linfócitos T auxiliares e citotóxicos (BEYER; SCHULTZE,

2009; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008;). Atuam também na inibição da maturação de linfócitos B em plasmócitos, reduzindo assim a produção de anticorpos (MAHNKE; BEDKE; ENK, 2007) e suprimindo a maturação de células dendríticas imaturas (BEYER; SCHULTZE, 2009).

Alguns trabalhos mostram a associação do EBV no recrutamento de linfócitos T reguladores, em situações neoplásicas como carcinoma de nasofaringe (LAU et al., 2007; YIP et al., 2009), linfomas de Hodgkin (BAUMFORTH et al., 2008) e não neoplásicas, como no controle da infecção primária pelo vírus (WINGATE et al., 2009).

Para o recrutamento de células imunossupressoras, ou ainda, para inibir a maturação de determinados tipos celulares, algumas neoplasias são capazes de induzir a expressão de citocinas e outras substâncias quimiotáticas como, por exemplo IL-10, que está associada a infecções virais (KHAN, 2006). Uma das citocinas mais potentes para o recrutamento de células dendríticas imaturas é conhecida como MIP3 α , do inglês *macrophage inflammatory protein 3 α* , ou proteína macrofágica inflamatória 3 α (DIEU-NOSJEAN et al., 2000).

A super expressão de MIP3 α é vista em várias neoplasias malignas (SCHUTYSER; STRUYF; van DAMME, 2003), sendo em alguns trabalhos relacionadas ao recrutamento de células dendríticas imaturas para a intimidade do tumor (BELL et al., 1999). Dois trabalhos recentes mostram a super expressão de MIP3 α em neoplasias malignas associadas ao EBV, como em carcinomas de nasofaringe (CHANG et al., 2008) e linfomas de Hodgkin (BAUMFORTH et al., 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar em quatro situações diferentes de infecção pelo EBV – não neoplásicas (amígdalites crônicas e

leucoplasia pilosa e neoplásicas (linfomas de Hodgkin e carcinoma de nasofaringe) – o fenômeno de imunotolerância, através da análise da presença de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores FOXP3+, assim como a expressão da citocina MIP3 α .

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epstein-Barr vírus (EBV)

O vírus Epstein-Barr faz parte da família dos vírus herpes humanos (HHV-4), que infecta aproximadamente 95% da população adulta mundial (RICKINSON; KIEFF, 1996). O vírus latente infecta linfócitos B circulantes e, na maior parte das vezes, leva à infecção subclínica. Porém, o EBV pode estar associado a algumas doenças, malignas e benignas (FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000).

O EBV foi primeiramente descrito em 1964 em cultura de células de linfomas de Burkitt de pacientes africanos (EPSTEIN; ACHONG; BARR, 1964). Desde então, o vírus tem sido isolado em outras neoplasias, em muitas das quais seu papel etiológico já foi bem estabelecido. Porém, para algumas destas neoplasias, mais estudos devem ser realizados na tentativa de elucidação de um possível papel patogênico desse vírus. As neoplasias de origem linfóide ligadas ao EBV incluem desordens linfoproliferativas em pacientes imunocomprometidos (CAILLARD; LACHAT; MOULIN, 2000), alguns linfomas de Hodgkin (GANDHI; TELLAM; KANNA, 2004) e alguns tipos de linfoma de células T (CRAWFORD, 2001).

Em pacientes imunocompetentes portadores do EBV, pode haver o estabelecimento de uma infecção persistente e de longa duração, com liberação constante ou intermitente do vírus através da saliva, infectando outros indivíduos através do contato oral. A infecção primária normalmente ocorre na infância de

forma assintomática, porém, quando ocorre na adolescência, em aproximadamente 30-50% dos casos causam a mononucleose infecciosa (RICKINSON; KIEFF, 1996).

O EBV tem dois tipos celulares principais como alvo: linfócitos B e células epiteliais (PEGTEL; MIDDELDORP; THORLEY-LAWSON, 2004). No entanto, estes vírus podem infectar outros tipos celulares, como linfócitos T e células NK (HUDNALL et al., 2005). A capacidade do EBV em infectar linfócitos é vista na detecção freqüente do vírus em linfomas de Burkitt e também em sua capacidade em transformar linfócitos B periféricos em uma linhagem celular linfoblastóide de crescimento contínuo. A infecção de células epiteliais pode ser observada em aproximadamente todos os casos de carcinoma de nasofaringe, em alguns casos de carcinoma de estômago e pela detecção da fase replicativa do vírus em lesões de leucoplasia pilosa (GREENSPAN et al., 1985; RICKINSON; KIEFF, 1996).

A infecção dos linfócitos B se dá pela adsorção do vírus à molécula CD21 na superfície celular. A ligação é feita por uma glicoproteína do envelope viral (gp350/220) que também é responsável pela interiorização do vírus através do mecanismo de endocitose (MARUO; YANG; TAKADA, 2001). No interior celular, o DNA viral migra para o núcleo onde é circularizado formando um epissomo (RICKINSON; KIEFF, 1996). Este processo *in vitro* transforma linfócitos B em linhagem linfoblastóide de crescimento permanente, que começam a expressar uma variedade de genes do ciclo latente; seis antígenos nucleares (EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C e LP), três proteínas de membrana latente (LMP 1, 2A e 2B) e duas pequenas seqüências de RNA não poliadeniladas (EBER 1 e 2), sendo essas também expressas no ciclo produtivo (RICKINSON; KIEFF, 1996).

Podem ser reconhecidos três tipos de latência dependendo da variedade de expressão dos genes. A latência III (Lat III) está presente em linhagens celulares

linfoblastóides, sendo as outras duas formas associadas a neoplasias. Nos linfomas de Burkitt somente as EBERs e EBNA 1 são regularmente expressas (Lat I), enquanto que em linfomas de Hodgkin e carcinomas de nasofaringe as LMPs são também expressas (RICKINSON; KIEFF, 1996).

A mudança da fase latente para a fase lítica é precedida pela expressão da proteína BZLF1 (ZEBRA), um produto gênico imediato. Essa proteína age na ativação do gatilho para a replicação viral e também estimula outras proteínas como BHRF1, responsável pela produção da DNA polimerase viral e da timidina quinase, que são importantes para a replicação do DNA viral. Finalmente produtos gênicos mais tardios são sintetizados, incluindo componentes estruturais dos *virions*, como o antígeno do capsídeo viral (VCA) e a glicoproteína de envelope gp350 (RICKINSON; KIEFF, 1996).

A infecção primária com o EBV ocorre na maioria das vezes na orofaringe através do contato com a saliva de um indivíduo contaminado. Depois da infecção primária, o vírus pode estabelecer uma infecção persistente nos indivíduos contaminados (FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000).

A presença do EBV em carcinomas de nasofaringe, a detecção do vírus no ciclo replicativo em células epiteliais da orofaringe de pacientes com mononucleose infecciosa e em lesões de leucoplasia pilosa, levaram a crer num papel central do epitélio orofaríngeo na infecção primária e persistente do EBV.

Levantou-se a hipótese de que o alvo primário do EBV seriam as células epiteliais. De acordo com este modelo, o vírus poderia replicar-se nas camadas mais diferenciadas do epitélio e persistir na camada basal, sendo a infecção dos linfócitos B um evento secundário (CRAWFORD, 2001).

Porém, estudos mais recentes contestam este conceito. Em tecidos de pacientes com mononucleose infecciosa, o EBV é detectado em linfócitos B, mas não em células epiteliais, sugerindo assim que linfócitos B das tonsilas possam ser o alvo primário da infecção pelo EBV (FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000; HUDNALL et al., 2005).

A infecção latente do EBV em células epiteliais normais é um evento raro (MILLER et al., 1994; HERRMANN et al., 2002; FRANGOU; BUETTNER; NIEDOBITEK, 2005). Com uso de técnicas de imunoistoquímica e hibridização *in situ*, trabalho de Herrmann et al demonstrou a evidência de replicação do EBV em células epiteliais da língua em 4 de 164 amostras de 84 casos de autópsias. Em pacientes soronegativos para o HIV, células epiteliais da língua raramente apresentaram replicação do EBV. Todos os indivíduos com evidência de replicação viral eram imunocomprometidos, sugerindo um papel importante do sistema imunológico no controle do ciclo lítico do EBV em células epiteliais. Os achados do estudo revelaram que a replicação do EBV no epitélio orofaríngeo não é um evento freqüente (HERRMANN et al., 2002). Mesmo em tonsilas palatinas, reservatório natural do EBV em pacientes imunocompetentes, a infecção de células epiteliais é um evento muito raro (HUDNALL et al., 2005).

O papel da saliva na transmissão do EBV estimulou a investigação da ligação entre o EBV e doenças das glândulas salivares (RIVERA et al., 2003), principalmente em pacientes portadores da síndrome de Sjögren, apresentando resultados bastante conflitantes, não estabelecendo um papel do EBV na etiopatogênese da síndrome (NAGATA et al., 2004).

2.2 Amígdalas

A faringe abriga um conjunto de formações linfóides distribuída em toda a sua extensão, denominado de anel linfático de Waldeyer, que faz parte do que se conhece como MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*). Fazem parte dessa estrutura as tonsilas faríngeas ou adenóides, as tonsilas palatinas ou amígdalas e a tonsila lingual (PERRY; WHYTE, 1998). Representam uma das primeiras barreiras contra a entrada de patógenos no organismo, pois estão situadas na entrada das vias aéreas e digestiva (KUPER et al., 1992).

O tecido linfóide que compõe as amígdalas é composto essencialmente por linfócitos B, que ocupam principalmente os folículos e centros germinativos, e linfócitos T, que ocupam as regiões mais periféricas ou extra-foliculares (Figura 2.1). Recobrimdo essa estrutura, observa-se presença de epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado, que se invagina para o interior das tonsilas, formando as chamadas criptas. Essa invaginação do epitélio garante uma área de superfície bastante aumentada, facilitando assim o contato com os antígenos externos. O epitélio das criptas é rico em células dendríticas, que são responsáveis pela captura e transporte de antígenos para áreas extra-foliculares ricas em linfócitos T e para os centros germinativos, ricos em linfócitos B (Figura 2.1) (BRANDTZAEG, 2003).

Figura 2.1 – Amígdalas - **A** -Região extra-folicular rica em linfócitos T – imunoistoquímica (anticorpo anti-CD3); **B** – Centro germinativo rico em linfócitos B – imunoistoquímica (anticorpo anti-CD20); **C** – Epitélio de cripta amigdaliana rico em células dendríticas – imunoistoquímica (anticorpo anti-CD1a) (A/B - aumento de 200X; C – aumento de 400X)

As tonsilas possuem um papel central no estabelecimento da infecção crônica pelo EBV, porém o mecanismo através do qual isso ocorre ainda é pouco conhecido (YOUNG; RICKINSON, 2004). Duas regiões em especial são importantes nesse contexto: o epitélio amigdaliano (HADINOTO et al., 2009) e os centros germinativos (ROUGHAN; THORLEY-LAWSON, 2009).

A infecção primária pelo EBV normalmente é assintomática, porém, quando ocorre na adolescência pode apresentar sintomatologia específica, ocasionando a mononucleose infecciosa (HADINOTO et al., 2008). Há o estabelecimento de um foco primário de infecção pelo EBV no ciclo replicativo no epitélio da região orofaríngea, e logo depois, essas partículas virais infectam linfócitos B na forma latente (programa de latência III). No interior dos órgãos linfóides do anel de Waldeyer, esses linfócitos B começam a proliferar, sendo controlada em parte pela resposta primária de linfócitos T. Porém, alguns desses linfócitos B proliferantes escapam da resposta imunológica, pois em seu programa de latência suprimem a expressão de inúmeras proteínas virais antigênicas, estabelecendo dessa forma um reservatório de linfócitos B de memória infectados pelo genoma viral, que a partir dessa fase suprimem ainda mais a expressão de antígenos virais, estabelecendo o programa de latência zero. Pode-se verificar todo esse processo no esquema da figura 2.2 (YOUNG; RICKINSON, 2004).

Em trabalho publicado recentemente, Wingate e colaboradores mostram que linfócitos T reguladores FOXP3⁺ são importantes no controle da infecção primária do EBV em níveis subclínicos na maioria dos casos, e que nos casos da mononucleose infecciosa, há a falha desse mecanismo de imunotolerância viral mediada por linfócitos T reguladores (WINGATE et al., 2009).

Após a infecção primária, o reservatório de linfócitos B de memória EBV positivos é controlado fisiologicamente no que se refere à migração e diferenciação dessas células. Ocasionalmente, esses linfócitos B infectados pelo EBV podem migrar para os centros germinativos ativos, podendo assim ativar outros programas de latência, multiplicarem-se e seguirem dois caminhos: ou a diferenciação em plasmócitos, ou a re-população do reservatório de linfócitos B de memória EBV

positivos. Esses plasmócitos infectados podem migrar para áreas da mucosa da orofaringe, onde há a reativação do ciclo replicativo em células epiteliais, ocorrendo a excreção de partículas virais na saliva. Esses vírions também podem infectar novos linfócitos B ou linfócitos B de memória, em que haveria a reativação do programa III de latência, para renovar assim o estoque de linfócitos B de memória infectados, porém, essa nova infecção é bem controlada pela resposta imunológica mediada por linfócitos T. Todo esse processo de estabelecimento da infecção persistente do EBV em indivíduos imunocompetentes pode ser visto no esquema b da figura 2.2 (YOUNG; RICKINSON, 2004).

Trabalho de Hudnall e colaboradores mostrou, através de dupla marcação imunoistoquímica e hibridização *in situ*, que a maior parte das células infectadas em tonsilas palatinas são de linfócitos B, porém, podendo infectar também linfócitos T e células plasmocitóides. Outros tipos celulares presentes nas amígdalas como células NK e células epiteliais raramente foram infectadas pelo vírus (HUDNALL et al., 2005).

Alguns autores associam a ocorrência de tonsilites recorrentes, principalmente em crianças, com a presença do EBV, contudo não sendo provado ainda o papel etiológico do vírus (ENDO et al., 2001), pois a infecção pelo EBV é vista em mais de 90% dos casos de tonsilas analisadas, sem qualquer relação com tonsilites (HUDNALL et al., 2005).

Figura 2.2 – Infecção primária e persistente pelo EBV

Fonte: Epstein Barr-virus: 40 years on. Nat Rev Cancer 2004;4:757-68.

2.3 Linfoma de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin é uma neoplasia singular, pois é a única em que as células malignas constituem uma pequena parte do tumor, representando de 1 a 2 % do total da neoplasia. É caracterizado pela desorganização da arquitetura dos linfonodos afetados e pela presença de um pequeno número de células neoplásicas de citoplasma amplo e mononucleadas, as células de Hodgkin, e multinucleadas, as células de Reed-Sternberg. A maior parte da lesão é composta por células inflamatórias não neoplásicas (JAFFE et al., 2001). Os linfomas de Hodgkin clássicos são divididos em 4 subtipos morfológicos: esclero-nodular; celularidade mista; rico em linfócitos e pobre em linfócitos, sendo que os dois últimos subtipos são raros, representando menos de 5% dos casos de linfomas de Hodgkin (GANDHI; TELLAM; KHANNA, 2004). A origem das células de Reed-Sternberg ainda é discutida, porém alguns estudos apontam para uma origem de linhagens de linfócitos B para essas células neoplásicas (KUPPERS et al., 2003).

Em cerca de 30% a 50% dos casos de linfoma de Hodgkin, o EBV pode ser detectado em células de Reed-Sternberg, em que o vírus expressa um limitado número de genes, dentre eles, *Epstein-Barr nuclear antigen-1* (EBNA1) e *latent membrane proteins*, LMP1 e LMP2 (YOUNG; MURRAY, 2003).

A proporção de casos de linfomas de Hodgkin EBV positivos é geralmente mais alta em crianças, especialmente menores de 10 anos, e em pacientes maiores de 45 anos de idade (GLASER et al., 1997). Estudos epidemiológicos apontam a maioria de paciente homens e casos de celularidade mista dentre os casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos (FLAVELL et al., 2000). Com relação ao prognóstico, apresenta-se relativamente desfavorável em pacientes acima de 45

anos, sendo controverso nos outros grupos etários (GANDHI; TELLAM; KHANNA, 2004; CLARK et al., 2001).

Em pacientes imunossuprimidos, como transplantados de órgãos sólidos e paciente HIV positivos, linfomas de Hodgkin ocorrem com uma maior frequência, se comparado com a população em geral da mesma idade e sexo (CARBONE et al., 2009). Nestes indivíduos, o EBV é encontrado em aproximadamente 90% dos casos de linfoma de Hodgkin (CARBONE et al., 1999; COCKFIELD, 2001).

Linfomas de Hodgkin associados à infecção pelo HIV apresentam características particulares comparados aos casos na população em geral. Exibem comportamento clínico agressivo, difícil terapêutica e prognóstico pobre; apresentam histopatologia peculiar, sendo representada pelo tipo mais agressivo entre os linfomas de Hodgkin clássicos (celularidade mista) e por um subtipo raro na população em geral, denominado depleção de linfócitos, e ainda, por apresentar uma grande proporção de células neoplásicas - células de Reed-Sternberg (GROGG; MILLER; DOGAN, 2007).

Os linfomas de Hodgkin apresentam inúmeras estratégias para escapar do sistema imunológico, sendo provavelmente ligadas ao estabelecimento de uma imunossupressão local, dificultando o reconhecimento e destruição das células neoplásicas (POPPEMA et al., 1999). Uma das explicações para este microambiente imunotolerante, seria a expressão de citocinas e de quimiocinas imunossupressoras pelas células neoplásicas ou outras células que compõem o tumor, permitindo assim que as células de Reed-Sternberg continuem a proliferar, escapar da apoptose e de mecanismos anti-tumorais do sistema imunológico (BAUMFORTH et al., 2008; BEN-BARUCH, 2006; KHAN, 2006; MAGGIO et al., 2002). Algumas células inflamatórias que compõem o tumor, como por exemplo os

linfócitos T reguladores (T reg), também participam da imunossupressão nos tecidos tumorais (BAUMFORTH et al., 2008).

2.4 Carcinoma de Nasofaringe

O carcinoma de nasofaringe é uma neoplasia maligna rara em países ocidentais, porém apresentando uma grande incidência na China e em algumas partes do sudeste asiático (OU et al., 2007).

As características morfológicas do carcinoma de nasofaringe foram descritas e organizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005 (CHAN et al., 2005), subdividindo as lesões em 3 grupos: carcinoma epidermóide queratinizado (tipo I), carcinoma não-queratinizado (tipo II) e carcinoma indiferenciado (tipo III). A associação com o EBV se dá em virtualmente todos os casos, independente da região geográfica considerada, porém, apenas uma pequena proporção dos casos de carcinoma de nasofaringe queratinizados são EBV positivos em regiões de baixa incidência da lesão (PATHMANATHAN et al., 1995).

A infecção latente do EBV em células epiteliais é um evento muito raro e pouco compreendido. Estudos com tecido normal e lesões cancerizáveis da região de nasofaringe, de pacientes com alto risco para o desenvolvimento de carcinoma da mesma região anatômica, indicaram a inativação de RASSF1A e p16 como eventos precoces na carcinogênese da lesão, sendo que estes eventos predisporiam o epitélio normal para uma subsequente infecção por EBV, oriundo do tecido linfóide adjacente e de linfócitos B circulantes (RAAB-TRAUB, 2002).

Como em carcinomas de nasofaringe invasivos, lesões *in situ* também são positivas para o EBV, sendo mais uma evidência de que a infecção pelo vírus é um evento precoce na patogênese da neoplasia (Figura 2.3) (PAK et al., 2002; YOUNG; RICKINSON, 2004).

A expressão dos genes de latência do EBV em carcinomas de nasofaringe consiste na latência do tipo II, principalmente EBNA1, as proteínas latentes de membrana LMP2A e LMP2B, transcritos BamHIA, e a proteína oncogênica LMP1 (MAINOU; RAAB-TRAUB, 2006; RAAB-TRAUB, 2002). Estudos mostram a monoclonalidade do genoma viral em carcinomas de nasofaringe, indicando que a infecção pelo EBV ocorre antes da expansão clonal das células neoplásicas (PATHMANATHAN et al., 1995; RAAB-TRAUB; FLYNN, 1986).

Existem inúmeros testes para detecção do EBV na prática clínica, podendo ser utilizados para monitoramento da efetividade da terapia e controle de recidivas em pacientes com carcinoma de nasofaringe (GULLEY, 2001).

Um dos mais utilizados é a dosagem de anticorpos IgA para o antígeno do capsídeo viral (VCA) (GULLEY, 2001). Estudos mais recentes utilizam a PCR em tempo real quantitativo para a mensuração do EBV circulante no sangue de pacientes com carcinoma de nasofaringe, mostrando que os níveis encontrados pré-tratamento são intimamente ligados com a taxa de sobrevida dos pacientes, e os níveis pós-tratamento podem predizer recidivas ou a sobrevida dos pacientes (LIN et al., 2004).

Figura 2.3 - Papel do EBV na patogênese do carcinoma de nasofaringe

Fonte: Epstein-Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer 2004;4:757-68.

A maneira mais simples para detecção do EBV em amostras parafinadas é a hibridização *in situ* para EBERs (*encoded early* RNAs), que são pequenos fragmentos de RNA não codificantes, produzidos em abundância pelo EBV em ambos os ciclos de infecção, porém com função ainda desconhecida. Em carcinomas de nasofaringe, observa-se positividade em praticamente todas as células tumorais (CHANG et al., 1992; GULLEY, 2001).

A imunoistoquímica para detecção do vírus é bastante limitada, pois a proteína LMP1 apresenta-se positiva em apenas 40% dos casos de carcinoma de nasofaringe e, além disso, sua marcação é de difícil interpretação, sendo pontual e discreta na maioria das vezes. O uso da PCR é bastante questionado, pois a

presença de poucos linfócitos B não-neoplásicos infectados poderiam levar a um falso positivo (GULLEY, 2001).

O tratamento para o carcinoma de nasofaringe é uma associação de radio e quimioterapia, levando a um sucesso terapêutico considerável, porém, numa parcela significativa de pacientes, o prognóstico continua bastante sombrio (AGULNIK; SIU, 2005; WANG et al., 2008). Na tentativa de tratamentos mais eficientes, com menos efeitos colaterais, atualmente propõem-se a imunoterapia, baseada na resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) e células dendríticas específicas para o EBV, mostrando-se bem tolerada, porém com resultados clínicos satisfatórios em poucos pacientes (MASMOUDI et al., 2007). A resposta clínica variável para estes tratamentos parece ser explicada pela evasão tumoral ao sistema imunológico, devido a um micro-ambiente de imunossupressão na neoplasia. Em carcinoma de nasofaringe, alguns estudos foram realizados para o entendimento deste fenômeno, que apontam atualmente para a participação de citocinas imunossupressoras como a MIP3 α (CHANG et al., 2008) e linfócitos T reg FOXP3+ (LAU et al., 2007; YIP et al., 2009) no fenômeno de imunotolerância tumoral em carcinomas de nasofaringe.

2.5 Leucoplasia Pilosa

A leucoplasia pilosa é uma lesão benigna da mucosa oral que acomete principalmente a borda lateral de língua, caracterizada pela replicação do EBV nas camadas superficiais do epitélio (RAAB-TRAUB; WEBSTER-CYRIAQUE, 1997; WALLING; FLAITS; NICHOLS, 2003). Foi descrita inicialmente como exclusivamente

associada à AIDS (GREENSPAN et al., 1984), porém, posteriormente à sua descrição, alguns casos foram diagnosticados em pacientes HIV-negativos transplantados de órgãos sólidos (GREENSPAN et al., 1989; MACLEOD; LONG; SOAMES, 1990; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997) ou imunossuprimidos cronicamente por outras razões (MIRANDA; LOZADA-NUR, 1996), associando assim a leucoplasia pilosa à imunossupressão de uma maneira geral.

Clinicamente, a leucoplasia pilosa apresenta-se como uma placa branca, corrugada, indolor, que não sede à raspagem, mais comumente encontrada em borda lateral de língua. Apresenta quadro histopatológico não patognomônico, caracterizado por hiperqueratose, degeneração balonizante, acantose e discreto ou ausente infiltrado inflamatório (BRAZ-SILVA et al., 2008; WALLING et al., 2004 a, b, c), sendo que para seu diagnóstico final há a necessidade da detecção do EBV, principalmente através da hibridização *in situ* (BRAZ-SILVA et al., 2006; BRAZ-SILVA et al., 2008).

A origem das partículas virais do EBV que infectam os queratinócitos na leucoplasia pilosa é um fator controverso na literatura.

A primeira teoria seria a reativação de uma infecção latente do EBV presente em células da camada basal do epitélio (BECKER et al., 1991; SANDVEJ et al., 1992; SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1993;). Essa teoria é bastante contestada, pela falta de evidências da expressão de genes do ciclo latente do EBV em células da camada basal. A segunda teoria seria uma infecção das células epiteliais por EBV presentes em linfócitos B que migrariam para o epitélio. Teoria também bastante contestada, pela escassez ou mesmo ausência de infiltrado inflamatório na lâmina própria adjacente (HILLE et al., 2002; RAAB-TRAUB; WEBSTER-CYRIAQUE, 1997).

A teoria mais aceita seria a da reinfecção constante por partículas virais oriundas de secreção orofaríngea e da saliva (CRUCHLEY et al., 1997; HERRMANN et al., 2002; HILLE et al., 2002; MILLER et al., 1994; RAAB-TRAUB; WEBSTER-CYRIAQUE, 1997; WALLING; FLAITZ; NICHOLS, 2003; TEO, 2002;). O suporte dessa teoria se dá pela falta de expressão de proteínas do ciclo latente do EBV em células da camada basal e pela detecção do vírus através de hibridização *in situ* somente nas áreas superficiais do epitélio. Outro fator importante para validação da hipótese é a detecção de partículas de EBV em secreções da orofaringe (FAFI-KRAMER et al., 2005; FRIAS et al., 2001; MAURMANN et al., 2003; WALLING; FALITZ; NICHOLS, 2003) e saliva (IDESAWA et al., 2004; IKUTA; HOSHIKAWA; SAIRENJI, 2000).

O EBV pode ser encontrado em toda a mucosa oral (AMMATUNA et al., 2001; AMMATUNA et al., 1998; BRAZ-SILVA et al., 2006), porém o local de predileção absoluta da lesão de leucoplasia pilosa é a língua, especialmente sua borda lateral (FARIA et al., 2005). Alguns autores têm relacionado essa predileção devido a uma diminuição das células de Langerhans na região de borda lateral de língua (DANIELS, 1984), também observadas em lesões de leucoplasia pilosa (DANIELS et al., 1987; BECKER, 2003; WALLING et al., 2004a; LILLY et al., 2005), podendo essas células estabelecer papel importante na patogênese da lesão.

A leucoplasia pilosa é caracterizada pelo ciclo replicativo do EBV nas camadas superficiais do epitélio. Porém alguns autores não acham suficiente o ciclo replicativo produtivo para explicar a patogênese da lesão (WALLING et al., 2001). Trabalhos mostram que a expressão de genes do ciclo latente seria importante cofator no desencadeamento da lesão (CRUCHLEY et al., 1997; WALLING et al.,

2004c). Mesmo com a expressão de genes do ciclo latente, estes só foram expressos nas camadas superficiais do epitélio (WALLING et al., 2004c).

2.6 Imunotolerância

Diversos mecanismos são utilizados para controlar a homeostase imunológica, prevenindo assim doenças auto-imunes e modulando a resposta inflamatória desencadeada por microorganismos patogênicos ou outros agentes ambientais (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Este conjunto de mecanismos é conhecido como imunotolerância periférica, que é caracterizada pela falta de resposta imunológica de linfócitos maduros a antígenos específicos, através da supressão da produção de anticorpos por linfócitos B e a inibição de linfócitos T citotóxicos, principalmente direcionados a auto-anticorpos.

Apesar de ser um mecanismo fisiológico, algumas neoplasias conseguem se aproveitar desse fenômeno para escapar do controle imunológico, possibilitando assim a progressão tumoral e o não reconhecimento de antígenos oriundos de células neoplásicas (XIAO-FENG QIN, 2009).

Dentre os principais participantes da imunotolerância tumoral, podemos citar elementos celulares, tais como, células dendríticas imaturas e linfócitos T reg e inúmeras citocinas imunossupressoras (IL10, TGF β , MIP3 α) que são responsáveis pelo recrutamento dessas células ao ambiente tumoral (MAHNKE; BEDKE; ENK, 2007).

2.6.1 Células dendríticas imaturas

Células dendríticas representam um grupo heterogêneo de células, de origem na medula óssea, que são apresentadoras de antígenos profissionais e desempenham um papel crucial para o desencadeamento da resposta imune primária de linfócitos T (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; STEINMAN, 1991). Essas células também são essenciais para a resposta imune anti-tumoral, principalmente pelo processamento de antígenos oriundos de células neoplásicas e sua apresentação pelo complexo de histocompatibilidade de classe I (MHC), desencadeando a resposta citotóxica por linfócitos TCD8⁺ (ARMSTRONG; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 1998). Porém, para que consiga realizar essas funções, as células dendríticas imaturas que residem nos tecidos, necessitam passar por um processo de amadurecimento (INABA et al., 2000).

Apesar de a capacidade das células dendríticas imaturas migrarem para áreas tumorais, capturar, processar e apresentar antígenos oriundos de células neoplásicas, não conseguem desencadear resposta imune específica de linfócitos T, pois para isso, precisam passar por um processo de maturação (BENNACEUR et al., 2009; GABRILOVICH, 2004). Além disso, recentemente, alguns autores mostram que células dendríticas imaturas ativas possuem um papel de tolerância imune (MAHNKE; KNOP; ENK, 2003).

Células neoplásicas podem escapar do sistema imunológico através de inúmeros mecanismos, tais como: perda dos antígenos tumorais, alterações nas moléculas de HLA I, falta de co-estimulação de células imunitárias, linfócitos T reg e citocinas imunossupressoras (KIM; EMI; TANABE, 2007; RABINOVICH;

GABRILOVICH; SOTOMAYOR, 2007). O ambiente tumoral é rico dessas citocinas, podendo ser produzidas diretamente pelas células neoplásicas ou por células imunes presentes no tumor. Além disto, essas citocinas impedem a maturação das células dendríticas e recrutam linfócitos T reg, criando assim um ambiente de tolerância imunitária às células neoplásicas (PRIES; NITSCH; WOLLENBERG, 2006).

Inúmeros trabalhos mostram a presença de células dendríticas, na maior parte das vezes de fenótipo imaturo, em diversos tipos de neoplasia, como melanoma (LÁDANYI et al., 2007), câncer de pulmão e mama (DELLA BELLA et al., 2003; WOJAS et al., 2004).

Tumores podem produzir inúmeros fatores imunossupressores que impedem a maturação de células dendríticas imaturas (Figura 2.4), sendo atualmente sabido que este defeito de diferenciação é sistêmico, e não restrito ao sítio tumoral. O aumento do número de células dendríticas imaturas em algumas neoplasias é devido ao aumento na migração dessas células para o tumor.

Trabalho de Bell et al. observou uma forte concentração de células dendríticas imaturas em carcinomas de mama, sendo localizadas no centro do tumor, enquanto células dendríticas de fenótipo maduro residiam na periferia. No mesmo estudo, pode-se constatar a expressão da citocina MIP3 α pelas células tumorais, considerada uma das mais potentes citocinas para o recrutamento de células dendríticas imaturas – células de Langerhans (BELL et al., 1999; DIEU-NOSJEAN et al., 2000). Essa citocina controla o recrutamento de células dendríticas imaturas (DIEU-NOSJEAN et al., 2000; HALLIDAY; LUCAS; BARNETSON, 1992) e impede a diferenciação dessas células em várias neoplasias (BELL et al., 1999; ZOU et al., 2001). Essas células dendríticas não podem induzir uma resposta imune

específica anti-tumoral, e mais importante, podem induzir um ambiente de imunotolerância (GABRILOVICH, 2004; MUTYAMBIZI; BERGER; EDELSON, 2009).

Figura 2.4 – Diferenciação de células dendríticas em neoplasias

Fonte: Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. Nature Rev 2004;4:941-52

A diferenciação anormal de células dendríticas em tumores pode resultar na falta de células dendríticas maduras, acúmulo e aumento de produção de células dendríticas imaturas e super expressão de citocinas imunossupressoras, proporcionando um ambiente desfavorável para resposta imune anti-tumoral (KUSMARTSEV, 2006). Além de citocinas imunossupressoras, antígenos e

metabólitos tumorais também podem impedir a diferenciação e funcionamento adequado das células dendríticas (MONTI et al., 2004).

Os mecanismos moleculares que afetam a diferenciação de células dendríticas em neoplasias ainda são pouco conhecidos, sendo que a família de proteínas STAT tem um importante papel na transição dos estágios de imaturidade para maturidade das células dendríticas (GABRILOVICH, 2004).

2.6.2 Linfócitos T reguladores

Linfócitos T reg FOXP3+ (fator de transcrição *Forkhead Box P3*) representam uma população de linfócitos T CD4+/CD25+ especializada na regulação do sistema imunológico, desempenhando papel essencial nos mecanismos de auto-tolerância (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; GAVIN et al., 2007; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003;).

Os mecanismos de imunossupressão dos linfócitos T reg estão ligados a 4 modos de ação básicos: supressão por citocinas imunossupressoras, tais como, IL-10, TGF β , MIP3 α , dentre outras; supressão por citólise, através da secreção de granzimas e perforinas, dando um efeito citotóxico aos linfócitos T reguladores; supressão por disfunção metabólica, como por exemplo o consumo de citocinas estimulatórias de linfócitos T como a IL-2 e supressão pela inibição da maturação de função de células dendríticas imaturas, que não conseguem processar e apresentar antígenos de forma adequada e, além disso, possuem função imunossupressora (Figura 2.5).

Figura 2.5 Mecanismos de imunossupressão de linfócitos Treg

Fonte: How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol 2008;8:523-32.

Os vírus da família *herpesviridae* são capazes de infectar o organismo hospedeiro, escapar do sistema imunológico e estabelecer uma infecção crônica (BILLERBECK; THIMME, 2008; KLENERMAN; HILL, 2005).

A persistência viral é devida a inúmeros mecanismos como, por exemplo, a manipulação da resposta imunológica inata por fatores virais que impedem ou dificultam a ativação da resposta específica anti-viral mediada por linfócitos T (BILLERBECK; THIMME, 2008; KLENERMAN; HILL, 2005). Essas respostas são essenciais para o controle dos vírus na fase aguda da infecção, e quando são ultrapassadas, há o estabelecimento da infecção crônica e persistência do vírus.

Este processo pode ser devido aos linfócitos T de função imunotolerante,

estimulados por citocinas inflamatórias imunossupressoras como a interleucina 10 (IL-10) (BROOKS et al., 2006).

A função dos linfócitos T reg no controle da infecção primária e persistente do EBV foi estudada recentemente por Wingate e colaboradores. O objetivo deste estudo foi verificar o papel de linfócitos T reg CD4+/CD25high/ FOXP3+ em pacientes com mononucleose aguda e pacientes EBV soropositivos saudáveis. Os autores verificaram uma menor proporção dessas células no sangue de pacientes com mononucleose, comparados com pacientes EBV+ saudáveis. As concentrações de citocinas imunossupressoras como IL-10 e TGF- β foram consideravelmente menores em paciente com mononucleose infecciosa. Esse estudo mostra que o mecanismo de imunoregulação controla a infecção do EBV em níveis subclínicos, sendo que paciente que apresentam o quadro clínico de mononucleose aguda apresentam uma falha neste mecanismo de proteção (WINGATE et al., 2009).

Algumas neoplasias são capazes de explorar certos mecanismos de imunotolerância para escaparem do controle imunológico do organismo. Vários estudos em pacientes com câncer e modelos experimentais em animais mostram que tumores são capazes de recrutar e expandir linfócitos T reg FOXP3+, suprimindo assim a resposta imune específica contra antígenos anti-tumorais. Este fenômeno, associado à interação destes linfócitos com células dendríticas imaturas, e a liberação de inúmeras citocinas imunossupressoras, criam no micro-ambiente tumoral uma situação de imunossupressão (XIAO-FENG QIN, 2009; BEYER; SCHULTZE, 2009) (Figura 2.6).

Vários tipos de tumores sólidos apresentam aumento dessa população de linfócitos T, tais como, carcinoma de ovário e pulmão (WOO et al., 2001), adenocarcinoma de mama e pâncreas (LIYANAGE et al., 2002), melanoma (JAVIA;

ROSENBERG, 2003), carcinomas gástricos (SASADA et al., 2003) e de cabeça e pescoço (SCHAEFER et al., 2005), e também neoplasias malignas hematológicas como linfomas de Hodgkin (MARSHALL et al., 2004) e linfomas B não Hodgkin (YANG et al., 2006).

Legenda: Setas em vermelho – inibição / setas em preto – estimulação / setas pontilhadas – produtos imunossupressores de células tumorais e inflamatórias

Figura 2.6 - Modelo de ação e acúmulo de Treg em neoplasias

Fonte: Regulatory T cells in cancer. Blood 2006; 108:804-11.

Estudos recentes mostram a associação de neoplasias relacionadas ao EBV e a presença de linfócitos T reg (BAUMFORTH et al., 2008; LAU et al., 2007; YIP et al., 2009).

Trabalho de Lau et al. (2007) mostrou uma maior concentração de linfócitos T reg FOXP3⁺CD4⁺CD25^{high} circulantes em pacientes com carcinoma de

nasofaringe, comparados a pacientes saudáveis da mesma faixa etária e sexo (LAU et al., 2007). Em 2009, outro grupo de autores mostrou a presença de linfócitos T reg FOXP3+ na região intra tumoral (YIP et al., 2009).

A associação desses achados mostra que há um aumento generalizado de linfócitos T reg e que os tumores são capazes de atrair essas células para o seu micro-ambiente. Em linfomas de Hodgkin EBV positivos analisou-se a presença destes linfócitos e a expressão da citocina CCL20 ou MIP3 α , e observou-se que a expressão dessa citocina promoveu o recrutamento de linfócitos T reguladores para o tumor, criando assim um ambiente de imunossupressão em linfomas de Hodgkin associados ao EBV (BAUMFORTTH et al., 2008). Esses trabalhos mostraram a capacidade do EBV em atrair linfócitos T reg para criar ao seu redor um ambiente tolerante do ponto de vista imunológico, e um deles associou este mecanismo à expressão de MIP3 α , uma citocina imunossupressora (BAUMFORTTH et al., 2008).

2.6.3 Proteína Macrofágica Inflamatória 3 α

No fenômeno de imunotolerância, as citocinas inflamatórias desempenham um papel primordial, pois são capazes do efeito de quimiotaxia de leucócitos e tem interferência direta em sua ação e diferenciação, estando envolvidas ainda em processos de angiogênese, morfogênese, crescimento tumoral e metástases (VICARI; CAUX, 2002; YOSHIE; IMAI; NOMIYAMA, 2001). Estas citocinas representam uma larga família de proteínas humanas, sendo divididas em 4 grupos

de acordo com a posição de sua porção cisteína terminal: CC, CXC, XC e CX₃C (SCHUTYSER; STRUYF; van DAMME, 2003).

A MIP3 α , ou CCL20, é uma quimiocina do tipo CC e é conhecida como um dos mais potentes quimiotáticos para células dendríticas imaturas e outras células inflamatórias (BELL et al., 1999; DIEU-NOSJEAN et al., 2000; YOSHIE; IMAI; NOMIYAMA, 2001). O aumento da expressão de MIP3 α foi vista em inúmeras doenças inflamatórias tais como psoríase (HOMEY et al., 2000), artrite reumatóide (MATSUI et al., 2001), algumas dermatites (NAKAYAMA et al., 2001), doença periodontal (HOSOKAWA et al., 2002) e doença inflamatória de Bowel (IZADPANAH et al., 2001; KWON et al., 2002).

Atualmente, o aumento na expressão de MIP3 α tem sido relacionado com algumas neoplasias, como adenocarcinoma de mama (BELL et al., 1999); carcinoma hepatocelular (SHIMIZU et al., 2000) e adenocarcinoma ductal pancreático, estando envolvida no crescimento e migração de células neoplásicas desse tumor (KIMSEY et al., 2004; KLEEFF et al., 1999). Estudos apontam para a super expressão dessa proteína em neoplasias malignas associadas ao EBV, como o carcinoma de nasofaringe (CHANG et al., 2008) e linfomas de Hodgkin EBV positivos (BAUMFORTH et al., 2008).

Trabalho de Chang e colaboradores analisou pela primeira vez a expressão de MIP3 α em carcinomas de nasofaringe. Foram analisados 275 pacientes com carcinoma de nasofaringe e 250 indivíduos saudáveis. Observou-se uma forte expressão da proteína em todos os casos de carcinoma de nasofaringe, analisados através de imunoistoquímica. Os níveis plasmáticos de MIP3 α foram significativamente mais altos em pacientes ainda não tratados, pacientes com recidivas e pacientes com metástase, comparados com os pacientes do grupo

controle, pacientes com completa remissão da doença e pacientes livres da doença por mais de cinco anos. Foram também realizados testes *in vitro* de função celular, mostrando que MIP3 α contribui para migração e invasão de células neoplásicas do carcinoma de nasofaringe. Os autores concluem que a proteína MIP3 α pode ser um novo marcador biológico e de prognóstico do carcinoma de nasofaringe e que está intimamente relacionado com o poder de migração e invasão da doença (CHANG et al., 2008).

Em 2008, Baumforth et al., através da análise de *microarrays* de tumores e linhagens celulares de linfoma de Hodgkin associados ao EBV, puderam notar um aumento na expressão de MIP3 α ou CCL20 pelas células de Hodgkin e Reed-Sternberg. Este aumento foi atribuído à expressão de EBNA 1 nessas células. Foi realizado um teste de quimiotaxia com sobrenadantes de linhagens de células de linfoma de Hodgkin com altas concentrações de MIP3 α , e observou-se a migração de linfócitos T reg FOXP3+. Com esses resultados, os autores identificaram um mecanismo pelo qual células infectadas pelo EBV podem recrutar linfócitos T reg para o interior do linfoma de Hodgkin, induzindo a expressão de MIP3 α e criando um micro-ambiente de imunossupressão, prevenindo assim respostas imunes contra células tumorais infectadas pelo vírus (BAUMFORTH et al., 2008).

Ainda com o foco na imunotolerância, Bell e colaboradores (1999) analisaram a presença de células dendríticas e expressão de MIP3 α em adenocarcinomas de mama. Foram estudadas 32 amostras de tecido parafinado por imunistoquímica para células dendríticas imaturas (CD1a+ e Langerin+) e maduras (CD83+), em que se observou forte concentração de células dendríticas de fenótipo imaturo na intimidade do tumor em 100% das amostras e 20 das 32 amostras apresentaram células dendríticas de fenótipo maduro, porém apenas na periferia do tumor. Observou-se

forte expressão de MIP3 α em todas as células neoplásicas. Como conclusão, os autores associam a migração de células dendríticas imaturas para o tumor como resultado do aumento da expressão de MIP3 α , o que criaria na intimidade do tumor um ambiente de tolerância imunológica, pois células dendríticas maduras, capazes de induzir uma resposta imunológica anti-tumoral mediadas por linfócitos T estavam presentes apenas na periferia do tumor (BELL et al., 1999). Estes achados foram logo corroborados pelo trabalho de Dieu-Nosjean et al. (2000), em que mostraram o papel da citocina MIP3 α no recrutamento e colonização por células de Langerhans em tecido epitelial (DIEU-NOSJEAN et al., 2000).

3 PROPOSIÇÃO

1. Analisar a presença de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores (T reg) em quatro diferentes situações de infecção pelo EBV (de linfócitos B não neoplásica: amígdalas; de linfócitos B neoplásica: linfomas de Hodgkin; epitelial neoplásica: carcinoma de nasofaringe e epitelial não neoplásica: leucoplasia pilosa).
2. Analisar a expressão da citocina MIP3 α nos casos estudados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, e do *Centre Hospitalier Universitaire Pasteur* (CHU) da *Université de Nice-Sophia Antipolis*, Nice, França.

Para tanto, foram selecionadas 60 amostras de tonsilas palatinas que foram analisadas quanto a presença do vírus Epstein-Barr pela PCR dos genes EBER 1 e 2. Após a análise, foram escolhidos 10 casos (8 EBV positivos e 2 EBV negativos), 19 casos de linfomas de Hodgkin e 6 casos de carcinoma de nasofaringe, oriundos dos arquivos do *Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale*, CHU de Nice, França. Os sete casos de leucoplasia pilosa foram obtidos nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Todas essas amostras foram submetidas à dupla marcação hibridização *in situ* (sondas EBER 1 e 2) e imunoistoquímica para os anticorpos monoclonais que marcam células dendríticas imaturas (CD1a e CD207 - langerina), células dendríticas maduras (CD83) e para proteína inflamatória macrofágica 3 α (MIP3 α / CCL20). Reações de imunoistoquímica foram realizadas com o anticorpo monoclonal FOXP3 para detecção de linfócitos T reguladores (T reg).

4.1 PCR (*Polymerase chain reaction*)

Para extração de DNA, foram realizados 15 cortes parafinados de 5 µm dos 60 casos de amígdalas analisados. Para desparafinização, estes cortes foram acondicionados em tubos de 1,5 ml contendo 1ml de xilol. Após agitação vigorosa, esses tubos foram colocados em banho maria (65 °C) por 1 min e posterior centrifugação a 14000 rpm (25 °C) por 2 min. Eliminou-se o sobrenadante e as etapas anteriores foram repetidas duas vezes. No precipitado obtido, adicionou-se 1ml de etanol 100%, agitou-se vigorosamente e os tubos foram centrifugados a 14000 rpm (25 °C) durante 2 min. Eliminou-se o sobrenadante e a etapa de adição de etanol e centrifugação foi realizada novamente. No precipitado obtido, adicionou-se 1 ml de etanol 75%, agitou-se vigorosamente os tubos que foram centrifugados a 14000 rpm (25 °C) por 2 min. O sobrenadante foi eliminado e os tubos com seus precipitados deixados abertos, a 25°C, para secarem durante 15 minutos.

Para extração do DNA, o precipitado foi ressuspenso em 250 µL de tampão de lise (Tris: 0,25g; EDTA: 0,75g; 10 mL de SDS 20% / 100 mL final) e adicionou-se 10 µL de proteinase K (100mg/mL) (Sigma®). Os tubos foram colocados em banho maria a 56°C por no mínimo 48h e no máximo 72h. O estado das amostras foi verificado a cada 24h. A digestão ideal das amostras é atingida quando observamos uma solução clara e um depósito no fundo do tubo. Após essa etapa, seguiu-se a purificação do DNA, adicionando-se aos tubos 260 µL de clorofórmio acrescido de álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados cuidadosamente e centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos (25 °C). Foi recuperada a fase aquosa e transferida para novos tubos. Para precipitar o DNA, adicionou-se 20 µL de acetato de sódio 0,3

M pH 5,6 e 500 µL de etanol 100%, misturou-se delicadamente e os tubos foram acondicionados no gelo durante 5 min. A seguir, os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi aspirado e ao precipitado adicionou-se 1 mL de etanol 75%. Os tubos foram agitados cuidadosamente e centrifugados a 10000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi eliminado o máximo possível e os tubos foram deixados abertos a 25 °C para a evaporação do etanol. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA). O DNA extraído foi dosado no NanoDrop® (Thermo Scientific) e estocado a -80 °C para posterior utilização.

Na reação de PCR para o EBV, utilizou-se como controle positivo um caso de linfoma plasmoblástico sabidamente EBV positivo através de hibridização *in situ*. Os iniciadores utilizados para reação foram escolhidos numa região preservada do EBV: região BamHI-K, que codifica EBNA-1. As sequências dos iniciadores foram as seguintes: senso 5'-GTC ATC ATC ATC CGG GTC TC-3'; antisenso 5'-TTC GGG TTG GAA CCT CCT TG-3'. O fragmento amplificado foi de 269pb.

As reações foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL com os seguintes reagentes: 1X tampão de PCR (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl), 0,28mM dNTP (2'deoxinucleotídeo 5'trifosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 250pM de cada iniciador (senso e antisenso), 2U de Taq DNA polimerase recombinante, 5µL das amostras de DNA e água estéril para completar um volume final de 25µL.

A amplificação do material genético foi realizada no termociclador Mastercycler® (Eppendorf). A denaturação inicial ocorreu a 95 °C durante 3 min. As amostras foram submetidas a 40 ciclos para amplificação do DNA: denaturação (94 °C por 1 min), hibridação (56 °C por 56 s.) e extensão (72 °C por 1 min). Após o

último ciclo, uma etapa de extensão final foi realizada a 72 °C durante 7 min. Todas as reações realizadas continham um controle negativo, que consistia em todos os reagentes da PCR e na substituição do DNA das amostras por água estéril.

Para visualização e análise do DNA amplificado pela PCR, realizou-se a eletroforese das amostras (75 V por 30 min) em gel de agarose a 2% com brometo de etídio (0,5g/ml) em cuba horizontal contendo tampão TAE (0.04M de Tris acetato e 0,001M de EDTA) 1X, pH 8,1. Para visualização das bandas de DNA, utilizou-se um transiluminador UV. A comparação das bandas de DNA foi feita através da análise de um marcador de peso molecular (Low DNA mass ladder), que apresenta uma mistura equimolar de fragmentos de 2.000 a 100 pares de base.

4.2 Hibridização *in situ* (EBER)

Os espécimes foram cortados na espessura de 3 µm e montados em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical Co., MO, USA) 10% em etanol 100% e secos em estufa a 37 °C por no mínimo 24 h.

Os cortes histológicos foram desparafinados em dois banhos de xilol (30 min. 59 °C, 20 min. 25 °C). Em seguida, os cortes foram hidratados em cadeia decrescente de etanol (100%, 95% e 85%) e depois de imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol 95% para remoção do pigmento formólico. Os preparados foram então lavados em água destilada por 10 min.

Toda a reação para a detecção do EBV (com exceção das sondas) foi realizada com o PNA ISH Detection Kit® (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), que continha lâminas controle, positivas e negativas a serem realizadas junto com cada bateria de lâminas.

Com as lâminas colocadas em câmara úmida, os cortes foram tratados com a enzima proteinase K, diluída em uma solução tampão à base de TRIS (Tris-hidroximetilainoetano) (10mM TRIS e NaCl, pH 7,6), na proporção de 1:10, durante 25 min em temperatura ambiente. Em cada corte utilizou-se 150 µL de proteinase K diluída. Após o período de 25 min, as lâminas foram incubadas por 3 min, duas vezes, em água destilada. Em seguida, passagem por etanol 95% por 10 s. Os cortes permaneceram por 5 min em câmara úmida para secarem.

Após o pré-tratamento dos cortes com a proteinase K, iniciou-se a reação de hibridização. Para tanto, colocou-se em cada corte 10 µL da sonda conjugada com a fluoresceína EBER (Y5200) (DakoCytomation Inc., CA, USA), sendo estes cobertos por uma lamínula de vidro. Os cortes dentro da câmara úmida foram levados para incubação em estufa a 55°C pelo período de 1h 30 min.

Retirada as lamínulas, os cortes foram imersos em solução de estringência pré – aquecida (Stringent Wash 50x concentrado, DAKO, S3500), na proporção de 1:60 em água destilada, e colocados em estufa a 55° C por 25 min. As lâminas foram então passadas por uma solução de TRIS (Tris-hidroximetilainoetano) (10mM TRIS e NaCl, pH 7,6).

Recolocaram-se as lâminas em câmara úmida e em cada corte, adicionou-se 150 µL do anticorpo Anti-FITC/AP incubando pelo período de 30 min em temperatura ambiente. O anticorpo foi removido com lavagem em TBS (Tampão salino de Tris,

pH 7,5). As lâminas foram colocadas em TBS pelo período de 3 min por duas vezes e logo após passadas por duas vezes em água destilada por 1 min.

Em câmara úmida, adicionou-se em cada corte 150 µL de substrato (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) e nitroblue tetrazolium (NBT)) que foram incubados por 45 minutos em temperatura ambiente. O substrato foi removido com água destilada e as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 min. Os espécimes positivos para o EBV mostravam os núcleos das células infectadas corados em azul escuro.

4.3 Imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram realizadas com a utilização dos kits EnVision Dual Link System HRP® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA) para anticorpos anti camundongo e anti coelho; LSAB System HRP® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA) para anticorpos anti cabra e EnVision® G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) (Dako Denmark®, Glostrup, Dinamarca).

4.3.1 Células dendríticas

Logo após a reação de hibridização *in situ*, as lâminas foram submetidas à tratamento com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1X, pH 8,0 em alta

temperatura para exposição dos epítomos. Este tratamento foi realizado em 3 ciclos de 5 min em microondas (potência 750 W).

As lâminas ficaram a 25° C por 30 min e logo após realizou-se um banho de PBS por 5 min. Em seguida, foram colocadas em câmara úmida para aplicação de 150 µL de peróxido de hidrogênio a 3% (Dual Endogenous Enzyme Block® - DakoCytomation®, Carpinteria, USA) durante 10 min para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram passados em PBS, recolocados na câmara úmida para a aplicação de 150 µL dos anticorpos primários monoclonais anti camundongo CD1a (Immunotech, França, clone O10) diluído na proporção de 1:1,5; CD207 (Novocastra, Reino Unido, clone 12D6) diluído na proporção de 1:100 e CD83 (Novocastra, Reino Unido, clone 1H4b) diluído na proporção de 1:20 e incubados a 25° C durante 1 hora. Após esse período, as lâminas passaram por um banho de PBS de 5 min, recolocadas na câmara úmida onde receberam 150 µL de anticorpo secundário associado ao polímero HRP (Labelled Polymer HRP® - DakoCytomation®, Carpinteria, USA) e incubadas por 30 min a 25° C. A seguir, as lâminas foram banhadas por 5 min em PBS e recolocadas em câmara úmida para aplicação do cromógeno diaminobenzidina (DAB) para revelação da reação. Aplicou-se 150 µL de Chromogene-Substrat® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA), numa proporção de 1 mL de substrato para 20 µL de DAB que deve ser misturado imediatamente. Após o período de incubação de 10 min, as lâminas foram enxaguadas com água estéril, e contra-coradas com o corante Fast-Red (DakoCytomation®, Carpinteria, USA) filtrado, por aproximadamente 5 min. Essas lâminas foram colocadas em água corrente por 3 min, e posteriormente submetidas à desidratação em banhos crescentes de álcool para montagem permanente no aparelho *Tissue Tek*® SCA (Sakura).

4.3.2 Linfócitos T reguladores (T reg)

Para detecção dos linfócitos T reguladores (T reg) utilizou-se o anticorpo primário monoclonal anti camundongo FOXP3 (AbCam, UK, clone 263A/E7), diluído na proporção de 1:100 e incubado durante o período de 1 hora. Este anticorpo foi utilizado em todos os casos com marcação simples, ou seja, as lâminas não haviam sido submetidas à hibridização *in situ* prévia. Foi realizada desparafinização inicial dos cortes, como descrito para hibridização *in situ*, e a técnica de imunoistoquímica foi a mesma para detecção das células dendríticas, com exceção feita à contra-coloração, que foi realizada nesse caso com hematoxilina de Mayer durante 3 minutos.

4.3.3 Proteína MIP3 α

Com o objetivo de analisar a co-expressão de células infectadas pelo EBV e da proteína MIP3 α realizou-se a dupla marcação hibridização *in situ* e imunoistoquímica nos casos de linfoma de Hodgkin.

Logo após a reação de hibridização *in situ*, as lâminas foram submetidas à tratamento com EDTA 1X, pH 8,0 em alta temperatura para exposição dos epítomos. Este tratamento foi realizado em 3 ciclos de 5 min em microondas (potência 750W).

As lâminas ficaram a 25°C por 30 minutos e logo após realizou-se um banho de PBS por 5 min. Em seguida, foram colocadas em câmara úmida para aplicação

de 150 µL de peróxido de hidrogênio a 3% durante 5 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Este ciclo foi repetido por 3 vezes. Os cortes foram passados em PBS, recolocados na câmara úmida para a aplicação de 150 µL do anticorpo monoclonal anti cabra MIP3α (CCL20) (R&D Systems, UK, clone AF360). As lâminas foram enxaguadas com PBS, colocadas em câmara úmida e em cada corte aplicado 150 µl do meio de ligação associado a biotina Biotinylated link® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA) durante 30 minutos (frasco amarelo). Após este período as lâminas foram enxaguadas com PBS, recolocadas em câmara úmida para aplicação de 150 µL de Streptavidin-HRP® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA) durante 30 minutos (frasco vermelho). As lâminas foram novamente enxaguadas, e na câmara úmida, receberam 150 µL de Chromogene-Substrat® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA), numa proporção de 1mL de substrato para 20 µL de DAB que deve ser misturada imediatamente. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram enxaguadas com água estéril, e contra-coradas com o corante Fast-Red (DakoCytomation®, Carpinteria, USA) filtrado por aproximadamente 5 minutos. Essas lâminas foram colocadas em água corrente por 3 minutos, e posteriormente submetidas à desidratação em banhos crescentes de álcool para montagem permanente no aparelho *Tissue Tek*® SCA (Sakura).

Os casos de carcinoma de nasofaringe e leucoplasia pilosa, a reação de imunoistoquímica para MIP3α (CCL20) ocorreu sem a realização prévia de hibridização *in situ* para o EBV, sendo que os passos para a reação obedeceram as descrições acima, apenas com a modificação da contra-coloração, sendo realizada com hematoxilina de Mayer durante 3 minutos.

4.3.4 Dupla marcação imunoistoquímica (MIP3 α e CD207)

Os casos de linfoma de Hodgkin EBV+ e de carcinoma de nasofaringe foram submetidos à dupla-marcação imunoistoquímica para os anticorpos MIP3 α e CD207. Primeiramente, realizou-se a reação de imunoistoquímica para MIP3 α como descrito anteriormente. Logo após, para a marcação de CD207, utilizou-se o kit EnVision® G/2 Doublestain System, Rabbit/Mouse (DAB+/Permanent Red) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Após a coloração da reação de MIP3 α , aplicou-se 200 μ L de solução de bloqueio de dupla marcação (doublestain block) e incubou-se durante 3 min em câmara escura. Eliminou-se a solução de bloqueio com banho e PBS e em seguida, aplicou-se 200 μ L do anticorpo CD207 que foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Realizou-se lavagem em PBS e aplicação de 200 μ L da solução de ligação camundongo/coelho (Rabbit/Mouse LINK – solução tamponada contendo polímero de dextran ligado a anticorpos secundários dirigidos contra as imunoglobulinas de camundongo e de coelho) e incubação por 10 min. Após lavagem com PBS, aplicou-se 200 μ L do polímero AP (Polymer/AP – polímero de dextran conjugado à fosfatase alcalina e às imunoglobulinas isoladas por afinidade) que foi incubado por 30 minutos. Após enxágüe em dois banhos de PBS, aplicou-se 200 μ L da solução red permanent (100 partes de tampão substrato para 1 parte de cromógeno red permanent) e incubadas por 20 minutos. Após banho de água destilada de 5 minutos, as lâminas foram contra coloradas com hematoxilina de Mayer durante 3 minutos. As lâminas foram colocadas em água corrente por 3 minutos, e posteriormente submetidas à desidratação em banhos crescentes de álcool para montagem permanente no aparelho *Tissue Tek*® SCA (Sakura).

4.4 Análise dos Resultados

As lâminas foram observadas em microscópio de luz e as células positivas para a sonda EBER, para os anticorpos CD1a, CD207, CD83 e FOXP3 foram contadas pela técnica conhecida como *Hot Spot* (BELL et al., 1999). Essa técnica consiste na escolha de 3 campos mais significativos de todo o corte e na contagem de células, no aumento de 400X, destes 3 campos. O valor final se dá pela média dessas 3 contagens e é expresso em número de células / 0,2mm². Para as lâminas de dupla marcação (hibridização *in situ* e imunoistoquímica) as células EBV positivas e dendríticas foram contadas sempre no mesmo campo escolhido, sendo seu resultado expresso em pares, a saber, EBV/CD1a e EBV/CD207. A expressão de MIP3α/CCL20 foi dividida em 4 categorias: (-) não houve expressão, (+) fraca expressão, (++) expressão acentuada e (+++) forte expressão da proteína.

5 RESULTADOS

5.1 Linfoma de Hodgkin

Dos 19 casos de linfoma de Hodgkin analisados através da hibridização *in situ*, 5 casos mostraram positividade para o EBV (26,31%). Todos os casos analisados foram de linfomas de Hodgkin clássicos, sendo 18 do tipo esclero-nodular (94,7%) e 1 caso de celularidade mista (5,3%).

Foi observado uma grande concentração de células dendríticas imaturas CD1a+ (Figura 5.1 A, B e C) e CD207+ (Figura 5.1 F e G) nos 5 casos de linfoma de Hodgkin associados ao EBV. Em nenhum dos casos EBV negativos foi observada presença de células dendríticas imaturas CD1a+ e CD207+ (Figura 5.1 E e H). Mesmo nos casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos, a concentração de células dendríticas imaturas sempre estava ligada à infecção pelo EBV, pois em áreas não infectadas dos mesmos casos, não se notava presença de células dendríticas imaturas (Figura 5.1 D). Células dendríticas maduras CD83+ não foram observadas em nenhum caso de linfoma de Hodgkin EBV positivo (Figura 5.4 A e B) ou negativo (Figura 5.4 C).

A proteína MIP3 α ou CCL20 apresentou forte expressão nos 5 casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos, principalmente pelas células neoplásicas de *Red Sternberg* (Figura 5.6 A), não sendo expressa em nenhum dos casos EBV negativos (Figura 5.6 B). Constatou-se que células EBV positivas também expressam a

proteína MIP3 α , através da reação de dupla marcação hibridização in situ (EBER) e imunoistoquímica (MIP3 α / CCL20) (Figura 5.6 E e F).

Uma forte concentração de linfócitos T reguladores (T reg) foi observada em todos os casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos (Figura 5.7 A). Linfomas de Hodgkin EBV negativos mostraram pequena concentração ou ausência desses linfócitos (Figura 5.7 B).

A contagem de células de todos os casos de linfoma de Hodgkin e também a expressão da proteína MIP3 α encontram-se resumidos na tabela 5.1 e nos gráficos 5.1 e 5.2.

Gráfico 5.1 - Correlação de células EBER+/CD1a + em linfomas de Hodgkin

Gráfico 5.2 - Correlação de células EBER+/CD207+ em linfomas de Hodgkin

Tabela 5.1 - Linfoma de Hodgkin

Paciente	Sexo	Idade	EBER / CD1a*	EBER/ CD207*	CD83*	MIP3α**	FOXP3*
1	M	41	15/10	18/7	0	++	12
2	M	31	0/0	0/0	0	-	0
3	M	24	0/0	0/0	0	-	0
4	M	40	28/21	32/15	0	++	10
5	M	24	0/0	0/0	0	-	0
6	F	36	0/0	0/0	0	-	0
7	M	57	0/0	0/0	0	-	1
8	M	57	0/0	0/0	0	-	0
9	M	72	0/0	0/0	0	-	0
10	M	56	0/0	0/0	0	-	3
11	F	44	0/0	0/0	0	-	0
12	M	46	0/0	0/0	0	-	0
13	M	35	0/0	0/0	0	-	0
14	F	78	40/32	33/19	0	+++	51
15	M	73	35/42	48/30	0	+++	37
16	M	45	0/0	0/0	0	-	0
17	F	32	0/0	0/0	0	-	2
18	M	45	19/25	15/18	0	++	43
19	F	69	0/0	0/0	0	-	0

* Valores expressos em número de células/0.2mm²

** (-) não houve expressão; (++) expressão acentuada; (+++) forte expressão

5.2 Carcinoma de Nasofaringe

O diagnóstico de todos os casos de carcinoma de nasofaringe estudados foi de carcinoma indiferenciado, sempre associado ao EBV. Em todos os 6 casos analisados notou-se alta concentração de células dendríticas imaturas CD1a+ (Figura 5.2 A e B) e CD207+ (Figura 5.2 C e D), próximas ao epitélio neoplásico EBV positivo (Gráficos 5.3 e 5.4).

Gráfico 5.3 - Correlação de células EBER+ / CD1a+ em carcinomas de nasofaringe (CNF)

Gráfico 5.4 - Correlação de células EBER+ / CD207 em carcinomas de nasofaringe (CNF)

Nos carcinomas de nasofaringe não se observou presença de células dendríticas maduras CD83+ (Figura 5.4 D e E), salvo em um caso em que se notou uma pequena concentração numa área periférica da neoplasia (Figura 5.4 F).

A proteína MIP3 α foi fortemente expressa pelo epitélio neoplásico de todos os casos estudados (Figura 5.6 C). Com o uso da dupla marcação em imunoistoquímica, notou-se o contato de células dendríticas imaturas CD207+ e áreas que expressam MIP3 α em carcinomas de nasofaringe (Figura 5.6 G).

A presença de linfócitos T reguladores (T reg) foi observada em 100% dos casos de carcinoma de nasofaringe, apresentando uma concentração preferencialmente próxima às ilhas de epitélio neoplásico (Figura 5.7 C e D).

Os resultados referentes aos casos de carcinomas de nasofaringe encontram-se resumidos na tabela 5.2 e nos gráficos 5.3 e 5.4.

Tabela 5.2 - Carcinoma de nasofaringe

Paciente	Sexo	Idade	EBER/ CD1a*	EBER/ CD207*	CD83*	MIP3 α **	FOXP3*
1	M	59	45/22	52/30	8	+++	28
2	F	48	51/24	63/27	0	+++	31
3	M	64	43/28	50/31	0	++	25
4	M	59	65/39	70/41	0	++	37
5	M	72	70/42	82/37	0	+++	21
6	M	62	82/48	58/25	0	+++	42

* Valores expressos em número de células/0.2mm²

** (+ +) expressão acentuada; (+ + +) forte expressão

5.3 Amígdalas

Com relação à positividade para o EBV, pudemos constatar que 58 das 60 amostras de tonsilas palatinas analisadas foram positivas para o vírus (96,6%) através da análise da PCR. O diagnóstico histológico de 100% dos casos estudados foi de amigdalite crônica.

Dos 10 casos selecionados, pudemos observar uma forte concentração de células dendríticas imaturas em 3 casos (pacientes 4, 5 e 8), em regiões infectadas pelo EBV (Figura 5.3 A, B e C) e ausência dessas células nos 2 casos de tonsilas EBV negativas (pacientes 6 e 10), sendo que se notou a presença dessas células apenas no epitélio de superfície (Figura 5.3 D). Não se observou presença de células CD83+ nos casos analisados.

Com relação à expressão da citocina MIP3 α , foi fraca em todos os casos EBV positivos (Figura 5.6 D) e ausência de expressão nos dois casos EBV

negativos, sendo expressa somente em níveis basais por células do epitélio de superfície.

Linfócitos T reguladores foram observados em todos os casos analisados, apresentando uma maior concentração nas amostras dos pacientes 4, 5, 8 e 9, todos EBV positivos.

Todos os resultados encontram-se resumidos na tabela 5.3 e nos gráficos 5.5 e 5.6.

Gráfico 5.5 - Correlação de células EBER+ / CD1a+ em amígdalas

Tabela 5.3 – Amígdalas

Paciente	Sexo	Idade	EBER / CD1a*	EBER/ CD207*	CD83*	MIP3α**	FOXP3*
1	F	33	4/6	5/3	0	+	5
2	F	20	2/5	2/3	0	+	4
3	F	33	3/2	4/1	0	+	8
4	M	40	30/17	25/8	0	+	22
5	M	32	35/12	28/7	0	+	34
6	F	18	0/0	0/0	0	-	3
7	M	31	2/3	1/2	0	+	5
8	F	28	10/12	8/10	0	+	18
9	F	22	8/5	12/16	0	+	26
10	M	24	0/0	0/0	0	-	5

*

Valores expressos em número de células/0.2mm²

** (+ +) expressão acentuada; (+ + +) forte expressão

Gráfico 5.6 - Correlação de células EBER+ / CD207+ em amígdalas

5.4 Leucoplasia Pilosa

Nos casos de leucoplasia pilosa analisados, não se notou presença de células dendríticas imaturas (Figura 5.5 A e B e Gráficos 5.7 e 5.8) ou mesmo maduras (Figura 5.5 C).

Em todas as amostras analisadas, não se observou expressão da citocina MIP3 α .

Os resultados encontram-se resumidos na tabela 5.4 e nos gráficos 5.7 e 5.8.

Tabela 5.4 - Leucoplasia Pilosa

Paciente	Sexo	Idade	EBER / CD1a*	EBER / CD207*	CD83*	MIP3 α **
1	M	35	25/0	19/1	0	-
2	M	28	18/0	15/0	0	-
3	M	32	13/0	9/0	0	-
4	M	30	27/0	20/0	0	-
5	M	51	12/0	8/0	0	-
6	F	14	9/0	9/0	0	-
7	M	38	15/0	17/0	0	-

* Valores expressos em número de células/0.2mm²

** (-) não houve expressão

Gráfico 5.7 - Correlação de células EBER+ / CD1a+ em leucoplasia pilosa

Gráfico 5.8 - Correlação de células EBER+ / CD207+ em leucoplasia pilosa

Figura 5.1 – Concentração de células dendríticas imaturas em linfomas de Hodgkin –
A/B/C – Forte concentração de células dendríticas imaturas CD1a+ em linfomas de Hodgkin EBV positivos–dupla marcação hibridização *in situ* EBER (azul) e imunistoquímica (anticorpo anti-CD1a – marrom) (aumentos de 100X (A)/ 200X (B)/ 400X (C)); **D** – ausência de células dendríticas imaturas CD1a+ em região EBER negativa de um linfoma de Hodgkin EBV positivo – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunistoquímica (aumento de 200X); **E** – ausência de células dendríticas imaturas CD1a+ em casos de linfoma de Hodgkin não associados ao EBV – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunistoquímica (aumento de 200X); **F/G** – Forte concentração de células dendríticas imaturas CD207+ em linfomas de Hodgkin EBV positivos – Dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunistoquímica (anticorpo anti-CD207-langerina – marrom) (aumento de 200X (F) e 400X (G)); **H** – ausência de células dendríticas imaturas CD207+ em linfomas de Hodgkin EBV negativos – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunistoquímica (aumento de 200X).

Figura 5.2 – Concentração de células dendríticas imaturas em carcinomas de nasofaringe – A/B – Forte concentração de células dendríticas imaturas CD1a+ em carcinoma de nasofaringe – Dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunoistoquímica (aumentos de 100X (A) e 400X (B)); C/D – Forte concentração de células dendríticas imaturas CD207+ em carcinoma de nasofaringe – Dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunoistoquímica (aumentos de 200X (C) e 400X (D)).

Figura 5.3 – Concentração de células dendríticas imaturas em amígdalas – Forte concentração de células dendríticas imaturas CD1a+ em centros germinativos (A) áreas periféricas (B) de tonsilas palatinas EBV positivas – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunoistoquímica (aumento de 200X); C – ausência de células dendríticas imaturas CD1a+ em um centro germinativo EBER negativo de uma tonsila palatina EBV positiva – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunoistoquímica (aumento de 200X); D – Presença de células dendríticas imaturas CD1a+ exclusivamente no epitélio de superfície de tonsila palatina EBV negativa – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunoistoquímica (aumento de 200X).

Figura 5.4 – Células dendríticas maduras CD83 positivas – Ausência de células dendríticas maduras CD83+ em linfomas de Hodgkin EBV positivos (**A/B**) e EBV negativos (**C**) – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunoistoquímica (aumentos de 200X (**A/C**) e 400X (**B**)); **D/E** – ausência de células dendríticas maduras CD83+ em casos de carcinoma de nasofaringe – dupla marcação hibridização *in situ* EER e imunoistoquímica (aumentos de 200X (**D**) e 400X (**E**)); **F** – Baixa concentração de células dendríticas maduras CD83+ em área periférica de um caso de carcinoma de nasofaringe – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunoistoquímica (aumento de 400X).

Figura 5.5 – Células dendríticas em leucoplasia pilosa – Ausência de células dendríticas imaturas CD1a+ (A), CD207+ (B) e maduras CD83+ (C) em lesões de leucoplasia pilosa – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunohistoquímica (aumento de 200X).

Figura 5.6 – Expressão da citocina MIP3α – **A** – Forte expressão da proteína MIP3α por células de Red Sternberg em linfoma de Hodgkin EBV positivos – imunohistoquímica (aumento de 400X); **B** – Ausência de expressão de MIP3α em linfomas de Hodgkin não associados ao EBV – imunohistoquímica (aumento de 200X); **C** – Forte expressão de MIP3α por células epiteliais neoplásicas em carcinomas de nasofaringe – imunohistoquímica (aumento de 400X); **D** – Expressão de MIP3α por um número limitado de células em tonsilas palatinas EBV positivas - imunohistoquímica (aumento de 200X); **E/F** – Co-expressão de EBER e MIP3α em linfomas de Hodgkin – dupla marcação hibridização *in situ* EBER e imunohistoquímica (aumentos de 200X (E) e 400X (F)); **G/H** – Dupla marcação imunohistoquímica para MIP3α (marrom) e CD207 (vermelho), mostrando o contato de áreas que expressam a proteína MIP3α e células dendríticas imaturas CD207+ em carcinomas de nasofaringe (G) e linfomas de Hodgkin (H) (aumento de 1000X).

Figura 5.7 – Concentração de linfócitos T reguladores (FOXP3+) – A – Alta concentração de linfócitos T reguladores FOXP3+ em linfomas de Hodgkin associados ao EBV – imunoistoquímica (aumento de 400X); B – Ausência de linfócitos T reguladores FOXP3+ Hodgkin EBV negativos – imunoistoquímica (aumento de 400X); C/D – Alta concentração de linfócitos T reguladores FOXP3+ em carcinomas de nasofaringe – imunoistoquímica (aumentos de 100X (C) e 400X (D)).

6 DISCUSSÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) ou HHV-4 faz parte da grande família *herpesviridae* (RICKINSON; KIEFF, 1996). É um vírus extremamente eficiente no que diz respeito à infecção, pois está presente em aproximadamente 95% da população, especialmente na forma latente e assintomática (FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000). A infecção pelo EBV se dá pelo contato com a saliva contaminada de um indivíduo soropositivo, pois há a liberação de partículas virais em fluidos e secreções orofaríngeas (ROUGHAN; THORLEY-LAWSON, 2009). A primo-infecção ocorre na maioria das vezes de forma sub-clínica, porém, em alguns casos, principalmente quando ocorre na adolescência, apresenta-se com o quadro característico da mononucleose infecciosa (CRAWFORD, 2001).

Após o estabelecimento da infecção, o vírus entra em estado de latência, infectando principalmente linfócitos B circulantes (RICKINSON; KIEFF, 1996). Um dos principais reservatórios do vírus são os órgãos linfóides da região conhecida como Anel de Waldeyer, dos quais fazem parte as amígdalas palatinas (HUDNALL et al., 2005). Mesmo estando presente na maioria da população de forma assintomática, o EBV está envolvido em inúmeras doenças, malignas e benignas (FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000), especialmente nos pacientes imunodeprimidos (CARBONE et al., 2009).

A capacidade de estabelecimento de infecções persistentes virais no organismo hospedeiro se utiliza de estratégias na tentativa de diminuir reações imunológicas. Com essas reações dificultadas, o reconhecimento do agente invasor e conseqüente destruição de células infectadas fica prejudicado, facilitando assim a

permanência do vírus no organismo (BILLERBECK, THIMME, 2008). Os vírus são capazes de induzir a produção de citocinas imunossupressoras, recrutar células que possuem um papel imunoregulador e criar dessa forma, nos locais de infecção, um microambiente de imunossupressão ou de imunotolerância (BILLERBECK; THIMME, 2008).

A imunotolerância é um fenômeno que possui um papel fisiológico importantíssimo, pois através da auto-regulação do sistema imunológico com a inibição da proliferação e recrutamento de linfócitos TCD4 e TCD8, impede o desenvolvimento de doenças auto-imunes (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). Células dendríticas imaturas, linfócitos T reg e citocinas imunossupressoras são fundamentais para o estabelecimento desse mecanismo (BAUMFORTH et al., 2008; BENNACEUR et al., 2009; GABRILOVICH, 2004; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Atualmente sabe-se que alguns vírus e algumas neoplasias são capazes de reproduzir esse fenômeno para escaparem ao reconhecimento do sistema imunológico (BAUMFORTH et al., 2008; BENNACEUR et al., 2009; BILLERBECK; THIMME, 2008). Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar a existência de um microambiente imunotolerante através da análise da presença de células dendríticas imaturas, linfócitos T reg FOXP3+ e expressão da quimiocina MIP3 α em situações de infecção pelo EBV, tais como: linfomas de Hodgkin, carcinomas de nasofaringe, amígdalas palatinas e leucoplasia pilosa.

O linfoma de Hodgkin é uma neoplasia maligna de linfócitos B, caracterizada pela presença das células de Reed-Sternberg e de Hodgkin. Dentre os 19 casos de linfoma de Hodgkin analisados em nosso estudo, todos pertenciam a pacientes imunocompetentes e 5 foram positivos para o EBV (26,31%) por meio de

hibridização *in situ* para sonda EBER. Esses resultados coincidem com os da literatura que aponta a presença do EBV em cerca de 30% dos casos de linfoma de Hodgkin (GANDHI, 2004). Essa associação pode chegar a mais de 90% dos casos em pacientes imunodeprimidos (CARBONE et al., 2009).

Nosso trabalho foi o primeiro a mostrar uma forte infiltração de células dendríticas imaturas em linfomas de Hodgkin associados ao EBV. Todos os 5 casos EBER positivos mostraram grande concentração de células dendríticas imaturas (CD1a e CD207 positivas), sempre em regiões da neoplasia infectadas pelo vírus (Figura 5.1). Interessante notar que nenhum dos linfomas de Hodgkin EBER negativos apresentaram células dendríticas imaturas (Figura 5.1). Nos linfomas infectados, as células dendríticas se concentravam nas áreas de infecção, demonstrando a estreita correlação da presença do vírus com o recrutamento dessas células. Podemos observar nos gráficos 5.1 e 5.2 que houve correlação direta na quantidade de células dendríticas imaturas e células infectadas pelo EBV, que foi evidenciada pela contagem de células nas reações de dupla marcação pela técnica *Hot Spot*.

A participação do EBV nos carcinomas indiferenciados de nasofaringe se dá em praticamente todos os casos, independente da região geográfica considerada (PEREZ-ORDOÑEZ, 2007). Em nossa casuística, os 6 casos analisados foram de pacientes caucasianos, da região Mediterrânea, com diagnóstico histopatológico de carcinoma indiferenciado de nasofaringe, que apresentaram 100% de positividade para o EBV, por meio de hibridização *in situ* para a sonda EBER.

A infiltração de células dendríticas em neoplasias de diferenciação epitelial foi relatada pela primeira vez em 1999 em carcinomas de mama. Esse trabalho mostrou uma forte concentração de células dendríticas imaturas (células de Langerhans) no

microambiente tumoral e, perifericamente, notava-se presença de células dendríticas de fenótipo maduro (CD83+) (BELL et al., 1999).

Analisando carcinomas indiferenciados de nasofaringe, através da técnica de dupla marcação, mostramos pela primeira vez na literatura a infiltração de células dendríticas imaturas nessa neoplasia maligna. Todos os 6 casos analisados mostraram concentração de células dendríticas de fenótipo imaturo entremeadas às células neoplásicas sempre EBV positivas (Figura 5.2). Em um dos casos analisados, além da presença das células dendríticas imaturas, pudemos notar a presença de uma pequena concentração de células dendríticas de fenótipo maduro (CD83+) na periferia da lesão (Figura 5.4 F). Nossos achados são semelhantes aos encontrados em carcinoma de mama no que diz respeito à distribuição de células dendríticas. É interessante ressaltar que alguns tipos de carcinoma de mama podem estar relacionados ao EBV (ARBACH et al., 2006; BONNET et al., 1999), porém essa associação não foi estudada no trabalho em questão (BELL et al., 1999). Assim como observamos nos linfomas de Hodgkin, a quantidade de células dendríticas imaturas esteve associada à quantidade de células neoplásicas infectadas pelo EBV nos carcinomas de nasofaringe, o que podemos observar nos gráficos 5.3 e 5.4.

As amígdalas palatinas são consideradas como os maiores reservatórios naturais do EBV, apresentando uma positividade para o vírus maior do que 90% quando o tecido amigdaliano é analisado pela PCR (HUDNALL et al., 2005). Em nossa casuística, pudemos observar que das 60 amostras de amígdalas palatinas analisadas pela PCR, 58 foram positivas para o EBV (96,6%), mostrando resultados semelhantes aos encontrados na literatura.

Pudemos demonstrar pela primeira vez na literatura que há uma concentração de células dendríticas imaturas sempre próximas a regiões do tecido

amigdaliano infectado pelo EBV. Nos dois casos EBV negativos não pudemos observar presença de células dendríticas de fenótipo imaturo, assim como em áreas não infectadas de casos EBV positivos (Figura 5.3).

Trabalho de Hudnall et al. em 2005, utilizando a técnica de dupla marcação (hibridização *in situ* e imunoistoquímica), mostrou que a maioria das células infectadas pelo EBV em amígdalas palatinas são linfócitos B, porém podendo infectar outras células, como linfócitos T e raras células epiteliais. O referido trabalho não analisou a presença de células dendríticas. Em nossos casos, focamos a análise em células dendríticas imaturas, que foram observadas em todos os casos EBV positivos em áreas EBER +, e, nos dois casos EBER negativos, essas células foram observadas somente no epitélio de superfície (Figura 5.3 D), mostrando mais uma vez a correlação da presença do vírus para o recrutamento das células no estroma dos tecidos analisados.

A leucoplasia pilosa é uma lesão benigna da mucosa oral que afeta exclusivamente pacientes imunodeprimidos (BRAZ-SILVA et al., 2008), e que é fruto da replicação do EBV nas camadas superficiais do epitélio, sendo a única doença descrita até então causada pelo ciclo replicativo do vírus no epitélio de superfície (TEO, 2002).

Analisamos 7 casos de leucoplasia pilosa e todos foram positivos para o EBV, sendo essa positividade essencial para o diagnóstico definitivo da lesão, pois a mesma não apresenta critérios cito ou anátomo-patológicos específicos (BRAZ-SILVA et al., 2006; BRAZ-SILVA et al., 2008). Através da análise da dupla marcação, pudemos observar uma completa depleção de células dendríticas imaturas nas lesões de leucoplasia pilosa, para os dois marcadores do fenótipo imaturo utilizados (CD1a e CD207). Esses achados corroboram o trabalho de

Daniels et al., que analisaram 23 casos de leucoplasia pilosa e observaram uma completa ausência dessas células nas lesões observadas, utilizando-se para isso 3 marcadores para células de Langerhans (HLA-DR, HLA-DQ e T6), ou seja, de fenótipo imaturo (DANIELS et al., 1987).

A depleção de células dendríticas imaturas em lesões de leucoplasia pilosa parecem ir contra aos achados das três outras situações de infecção pelo EBV, em que encontramos sempre uma forte concentração dessas células em áreas infectadas pelo vírus. Este fato poderia ser explicado por dois motivos: a leucoplasia pilosa é uma lesão exclusiva de pacientes imunodeprimidos, principalmente HIV positivos, e desta forma, o vírus não necessitaria lançar mão de estratégias de imunoregulação para infectar as células do epitélio de revestimento da mucosa; o segundo motivo estaria relacionado ao ciclo replicativo do vírus que se comporta de maneira diferente do ciclo latente, sendo que a expressão de alguns genes virais do ciclo latente seriam importantes para o recrutamento de células dendríticas imaturas. Para entendermos essa diferença, estudos futuros em neoplasias malignas associadas ao EBV em pacientes imunodeprimidos com relação ao recrutamento de células dendríticas imaturas se fazem necessários.

Uma das citocinas mais potentes no recrutamento de células dendríticas imaturas é a quimiocina MIP3 α ou CCL20 (BELL et al., 1999; DIEU-NOSJEAN et al., 2000). O aumento de sua expressão está ligada à inúmeras neoplasias, dentre as quais, linfomas de Hodgkin associados ao EBV (BAUMFORTH et al., 2008) e carcinomas de nasofaringe (CHANG et al., 2008).

Em nossa casuística, pudemos notar a forte expressão de MIP3 α nos casos de linfoma de Hodgkin EBV +, principalmente em células de Reed-Sternberg (Tabela 5.1). Essa expressão foi negativa nos linfomas de Hodgkin não associados ao EBV.

Esses achados são semelhantes ao trabalho de Baumforth et al., que mostraram o aumento de expressão de CCL20 no microambiente tumoral de linfomas de Hodgkin EBV positivos (BAUMFORTH et al., 2008). Através da dupla marcação imunoistoquímica, pudemos também demonstrar a relação de proximidade entre células dendríticas imaturas e células que expressam MIP3 α (Figura 5.6 H). Também demonstramos que, além das células neoplásicas, que correspondem cerca de 2% da neoplasia (GANDHI, 2004), outros linfócitos B, infectados ou não pelo EBV, também podem expressar MIP3 α (Figura 5.6 E e F), aumentando assim o poder imunossupressor da neoplasia.

Trabalho recente de Chang et al. em 275 pacientes com carcinoma de nasofaringe e 250 controles, foi o primeiro a observar a superexpressão de MIP3 α através de imunoistoquímica e ELISA nos casos de carcinoma. Níveis plasmáticos da quimiocina mostraram-se significativamente mais altos em pacientes não tratados previamente, em pacientes com recorrência pacientes com metástases à distância em comparação ao grupo controle e a pacientes livres de doença acompanhados a longo termo. Testes de função celular com células de carcinoma de nasofaringe mostraram que MIP3 α contribuiu para invasão e migração das células neoplásicas. Os autores acreditam que MIP3 α pode ser considerada um novo marcador de prognóstico do carcinoma de nasofaringe e está envolvido na migração e invasão de suas células neoplásicas (CHANG et al., 2008).

Confirmando os achados de Chang et al, nos casos de carcinoma de nasofaringe por nós analisados, através de imunoistoquímica, pudemos notar forte expressão de MIP3 α em todo epitélio neoplásico (Figura 5.6 C) (CHANG et al., 2008).

A super-expressão de MIP3 α foi observada por trabalho de Bell et al. em carcinomas de mama, associando essa expressão ao recrutamento de células dendríticas imaturas (BELL et al, 1999). A super-expressão de MIP3 α nas condições neoplásicas por nós analisadas, mostrou-se sempre associada ao EBV (5 casos de linfoma de Hodgkin EBV positivos e 6 casos de carcinoma de nasofaringe), o que pode explicar o recrutamento de células dendríticas imaturas, e a criação, em torno dessas neoplasias, de um microambiente de imunotolerância.

A expressão de MIP3 α nos casos de tecido amigdaliano estudados, mostrou-se basal nos casos EBV positivos (Figura 5.6 D) e negativa nos casos não associados ao EBV (Tabela 5.3). Provavelmente, em situações não neoplásicas, o recrutamento de células dendríticas imaturas associado ao EBV, esteja ligado à expressão de outras quimiocinas, como RANTES (OHSHIMA et al., 2003), IL-10 ou TGF- β (WINGATE et al., 2009).

Todos os casos de leucoplasia pilosa analisados mostraram-se negativos para expressão de MIP3 α , o que corrobora o fato da ausência de células dendríticas imaturas nessas lesões.

A presença de linfócitos T reg é de extrema importância para o fenômeno imunoregulatório (BEYER; SCHULTZE, 2009). Um dos marcadores mais específicos para essa população de linfócitos é a expressão de FOXP3 (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; GAVIN et al., 2007; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). Essas células, juntamente às células dendríticas imaturas, possuem ações sinérgicas imunoregulatórias (MAHNKE et al., 2007).

Pela análise imunoistoquímica desse marcador, pudemos observar em todos os linfomas de Hodgkin EBV positivos analisados um forte infiltrado de linfócitos T reg, sobretudo em regiões próximas a células neoplásicas produtoras de MIP3 α ,

mostrando a capacidade dessas células em quimiotaxia para esses linfócitos que possuem papel regulador. Nossos achados são semelhantes aos encontrados por recente trabalho de Baumforth et al., que relacionou a superexpressão de MIP3 α com o recrutamento de linfócitos T reg FOXP3+ (BAUMFORTH et al., 2008).

Em carcinomas de nasofaringe, dois trabalhos recentes mostram uma maior concentração de linfócitos T reg em pacientes acometidos por essa neoplasia. Lau et al. mostraram expansão e maior concentração de linfócitos T reg (CD4+ CD25 high FOXP3+) no sangue circulante de 56 pacientes com carcinoma de nasofaringe (LAU et al., 2007). Yiup et al. mostraram a presença desses linfócitos presentes na intimidade do tumor (YIP; ABDULLAH; YOUSOFF; SEOW, 2009). Esses dados mostram que o fenômeno de imunotolerância não é apenas localizado, há primeiramente a expansão dessas células no sangue circulante e posteriormente o recrutamento das mesmas para a região do tumor, através da expressão de quimiocinas como a MIP3 α por exemplo. Nos nossos casos de carcinoma nasofaríngeo, pudemos observar forte concentração de linfócitos T reg, situados sobretudo em regiões de epitélio neoplásico (Figura 5.7 C e D).

Os linfócitos T reg foram recentemente implicados no controle da infecção primária pelo EBV. Estudo de Wingate et al. mostrou que pacientes com mononucleose infecciosa apresentam quantidades significativamente menores de linfócitos T reg no sangue circulante do que pacientes saudáveis. Os autores apresentam o mecanismo de imunotolerância como primordial para o controle assintomático da infecção primária. O descontrole desse mecanismo traduz-se na manifestação clínica da mononucleose infecciosa (WINGATE et al., 2009). Nos nossos casos de tecido amigdaliano observamos presença de linfócitos T reg em

grande quantidade na maioria dos casos EBV positivos, sendo mínima a presença em casos EBV negativos (Tabela 5.3).

Não analisamos a presença de linfócitos T reg nos casos de leucoplasia pilosa, pois, uma das principais características histopatológicas desta lesão é a presença de discreto ou mesmo ausência de infiltrado inflamatório mononuclear (BRAZ-SILVA et al., 2008).

Pudemos concluir de nossos achados que, em situações neoplásicas, o EBV é capaz de produzir um microambiente tumoral imunossupressor, através da super-expressão de MIP3 α , quimiocina essa que é capaz de recrutar células dendríticas imaturas (BELL et al., 1999; DIEU-NOSJEAN et al., 2000) e linfócitos T reg (BAUMFORTH et al., 2008). Essas células possuem um papel imunoregulador, inibindo a expansão e o reconhecimento de células tumorais por linfócitos TCD4 e TCD8, proporcionando assim um ambiente tolerante e permitindo a expansão e invasividade de células tumorais.

Realizamos a dupla marcação entre células dendríticas imaturas e linfócitos TCD8+ em linfomas de Hodgkin e carcinomas de nasofaringe e pudemos mostrar o íntimo contato entre essas células, o que inibiria o reconhecimento das células tumorais por estes linfócitos, impedindo assim a sua destruição (Figura 6.1).

Figura 6.1 – Contato de células dendríticas imaturas CD207+ (castanho - setas) e linfócitos T citotóxicos CD8+ (vermelho) em carcinoma de nasofaringe. (Aumento de 200X)

Em situações fisiológicas, como nas amostras de amígdalas por exemplo, acreditamos que as células dendríticas imaturas tenham participação importante no controle da infecção primária pelo EBV em níveis subclínicos, auxiliando assim a atividade dos linfócitos T reg no mecanismo de imunotolerância. A perturbação desse mecanismo poderia levar a quadros de mononucleose infecciosa, como proposto por Wingate et al. (WINGATE et al., 2009). Porém, diferentemente dos quadros neoplásicos, a quimiocina MIP3 α não possui papel importante, pois não observamos sua super-expressão.

Sabe-se atualmente que existe uma interatividade mútua entre as células dendríticas imaturas e linfócitos T reg no mecanismo de imunotolerância (MAHNKE; BEDKE; ENK, 2007), em que linfócitos T reg são capazes de impedir a maturação

de células dendríticas e essas, em seu fenótipo imaturo, são capazes de aumentar o recrutamento dessa população de linfócitos (MAHNKE; BEDKE; ENK, 2007). Em nossos resultados, pudemos observar esse microambiente imunotolerante relacionado ao EBV, com participação de linfócitos T reg, já descritos na literatura por outros autores (BAUMFORTH et al., 2008; LAU et al., 2007; YIP et al., 2009; WINGATE et al., 2009).

O entendimento de como funciona o mecanismo de imunotolerância em infecções virais é de extrema importância, principalmente no que diz respeito ao EBV, que apresenta um papel oncogênico bem estabelecido. Futuros trabalhos nesse sentido são essenciais não só para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro, mas também contribuiria consideravelmente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as neoplasias associadas ao EBV. Mas salientamos que, pela primeira vez na literatura, demonstramos a participação de células dendríticas imaturas em relação à imunotolerância em infecções por EBV.

7 CONCLUSÕES

1. Nas neoplasias relacionadas ao EBV demonstramos o ambiente imunotolerante caracterizado por super-expressão de MIP3 α , forte concentração de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores;
2. Nas amígdalas o ambiente imunossupressor caracterizado por concentração de células dendríticas imaturas e linfócitos T reguladores não está associado à super-expressão de MIP3 α , por se tratar de uma situação fisiológica onde outras citocinas provavelmente estejam envolvidas;
3. Na leucoplasia pilosa a depleção total de células dendríticas sugere a não indução de ambiente imunotolerante, possivelmente ligado ao ciclo de vida do EBV ou ao estado imunodeprimido do hospedeiro.

REFERÊNCIAS¹

Agulnik M, Siu LL. State-of-the-art management of nasopharyngeal carcinoma: current and future directions. *Br J Cancer* 2005;92:799-806.

Ammatuna P, Campisi G, Giovannelli L, Giambelluca D, Alaimo C, Mancuso S, et al. Presence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human papillomavirus in normal oral mucosa of HIV-infected and renal transplant patients. *Oral Dis* 2001;7:34-40.

Ammatuna P, Capone F, Giambelluca D, Pizzo I, D'Alia G, Margiotta V. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA and antigens in oral mucosa of renal transplant patients without clinical evidence of oral hairy leukoplakia (OHL). *J Oral Pathol Med* 1998;27:420-27.

Arbach H, Viglasky V, Lefeu F, Guinebretiere JM, Ramirez V, Bride N et al. Epstein Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol). *J Virol* 2006;80:845-53.

Armstrong TD, Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Tumor antigen presentation: changing the rules. *Cancer Immunol Immunother* 1998;46:70-4.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.

Baumforth KRN, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol* 2008;173:195-204.

Becker J, Leser U, Marschall M, Langford A, Jilg W, Gelderblom H et al. Expression of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans-activator genes depends on the differentiation of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:8332-6.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Becker Y. Immunological and regulatory functions of uninfected and virus infected immature and mature subtypes of dendritic cells-a review. *Virus Gen* 2003;26(3):119-30.

Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumour, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 1999;190:1417-25.

Ben-Baruch A. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:357-71.

Bennaceur K, Chapman JA, Touraine J, Portoukalian J. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochim Biophys Acta* 2009;1795:16-24.

Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment. *Curr Pharm Des* 2009; 15(16):1879-92.

Billerbeck E, Thimme R. CD8+ regulatory T cells in persistent human viral infections. *Hum Immunol* 2008;69:771-5.

Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G et al. Detection of Epstein Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1376-81.

Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids: everything the ENT surgeon needs to know. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;67S1:S69-S76.

Braz-Silva PH, Ortega KL, Rezende NP, Nunes FD, Magalhães MHCG. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in the oral mucosa of renal transplant patients. *Diagn Cytopathol* 2006;33(1):24-8.

Braz-Silva PH, Rezende NPM, Ortega KL, Santos RTM, Magalhães MHCG. Detection of the Epstein-Barr virus (EBV) by in situ hybridization as definitive diagnosis of hairy leukoplakia. *Head Neck Pathol* 2008;2:19-24.

Brooks DG, Trifilo MJ, Edelman KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 2006;12:1301-9.

Caillard S, Lachat V, Moulin B. Posttransplant lymphoproliferative disorders in renal allograft recipients: report of 53 cases of French multicenter study. *Transpl Int* 2000;13(Suppl 1):S388-93.

Carbone A, Gloghini A, Larocca LM, Antinori A, Falini B, Tirelli U. Human immunodeficiency virus-associated Hodgkin's disease derives from postgerminal center B cells. *Blood* 1999;93:2319-26.

Carbone A, Gloghini A, Serraino D, Spina M. HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Curr Opin HIV AIDS* 2009;4:3-10.

Chan JKC, Bray F, McCarron P, Foo W, Lee AWM, Yip T, et al. Nasopharyngeal carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck Tumors*. Lyon: IARC; 2005. p. 85-97.

Chang KL, Chen YY, Shibata D, Weiss LM. Description of an in situ hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagn Mol Pathol* 1992;1:246-55.

Chang KP, Hao SP, Chang JH, Wu CC, Tsang NM, Lee YS, et al. Macrophage inflammatory protein-3 α is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6979-87.

Clarke CA, Glaser SL, Dorfman RF, Mann R, DiGiuseppe JA, Prehn AW, et al. Epstein-Barr virus and survival after Hodgkin disease in a population-based series of women. *Cancer* 2001;91:1579-87.

Cockfield SM. Identifying the patient at risk for posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplant Infect Dis* 2001;358:297-8.

Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Phil Trans R Soc Lond B* 2001;356:461-73.

Cruchley AT, Murray PG, Niedobitek G, Reynolds GM, Williams DM, Young LS. The expression of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-I) in oral hairy leukoplakia. *Oral Dis* 1997;(3 Suppl 1):S177-S9.

Daniels TE. Human mucosal Langerhans cells: postmortem identification of regional variations in oral mucosa. *J Invest Dermatol* 1984;82:21-4.

Daniels TE, Greenspan D, Greenspan JS, Lennete E, Schiodt M, Petersen V, et al. Absence of Langerhans cells in oral hairy leukoplakia, AIDS-associated lesion. *J Invest Dermatol* 1987;89(2):178-82.

Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1463-72.

Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, et al. Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting langerhans cells precursors. *J Exp Med* 2000;192:705-17.

Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;1:702-3.

Endo LH, Ferreira D, Montenegro MC, Pinto GA, Altemani A, Bortoleto AE Jr, et al. Detection of Epstein Barr virus in tonsillar tissue of children and the relationship with recurrent tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2001;58:9-15.

Fafi-Kremer S, Morand P, Brion JP, Pavese P, Baccard M, Germi R, et al. Long-term shedding of infectious Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 2005;191:985-9.

Faria PR, Vargas PA, Saldiva PHN, Böhm GM, Mauad T, Almeida OP. Tongue diseases in advanced AIDS. *Oral Dis* 2005;11:72-80.

Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH. The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* 2000;8(4):185-9.

Flavell KJ, Biddulph JP, Constandinou CM, Lowe D, Scott K, Crocker J, et al. Variation in the frequency of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease with age. *Leukemia* 2000;14:748-53.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-6.

Frangou P, Buettner M, Niedobitek G. Epstein-Barr virus (EBV) infection in epithelial cells in vivo: rare detection of EBV replication in tongue mucosa but not in salivary glands. *J Infect Dis* 2005;191:238-42.

Frías C, Lauzurica R, Bayés B, Ausina V. Prospective follow-up of Epstein-Barr virus load in adult kidney transplant recipients by semiquantitative polymerase chain reaction in blood and saliva samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:892-5.

Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature Rev* 2004;4:941-52.

Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162-74.

Gandhi MK, Tellam JT, Kanna R. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br J Hematol* 2004;125:267-81.

Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445(7129):771-5.

Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarret RF, Brousset P, et al. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 1997;70:375-82.

Greenspan D, Greenspan JS, Conant M, Petersen V, Silverman S Jr, De Souza Y. Oral hairy leukoplakia in male homosexuals: evidence of association with both papillomavirus and a herpes-group virus. *Lancet* 1984;2(8407):831-4.

Greenspan D, Greenspan JS, De Souza YG, Levy JA, Ungar AM. Oral hairy leukoplakia in an HIV-negative renal transplant recipient. *J Oral Pathol Med* 1989;18:32-4.

Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V, et al. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS associated lesion. *New Engl J Med* 1985;313:1564-71.

Grogg KL, Miller RF, Dogan A. HIV infection and lymphoma. *J Clin Pathol* 2007;60:1365-72.

Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001;3:1-10.

Hadinoto V, Shapiro M, Greenough TC, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lowson DA. On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. *Blood* 2008; 111:1420-27.

Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lowson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* 2009;5(7):e1000496. doi:10.1371/journal.ppat.1000496.

Halliday GM, Lucas AD, Barnetson RS. Control of Langerhans' cells by a skin tumor-derived cytokine. *Immunol* 1992;77(1):13-8.

Herrmann K, Frangou P, Middeldorp J, Niedobitek G. Epstein-Barr virus replication in tongue epithelial cells. *J Gen Virol* 2002;83:2995-8.

Hille JJ, Webster-Cyriaque J, Palefsky JM, Raab-Traub N. Mechanisms of expression of HHV8, EBV and HPV in selected HIV-associated oral lesions. *Oral Dis* 2002;(8 Suppl 2):161-8.

Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn R, Massacrier C, RIn JJ, Oldhom E, et al. Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 2000;164:6621-32.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609):1057-61.

Hosokawa Y, Nakanishi T, Yamaguti D, Takahashi K, Yumoto H, Ozaki K, et al. Macrophage inflammatory protein 3 α -CC chemokine receptor 6 interactions play an important role in CD4+ T-cell accumulation in periodontal disease tissue. *Clin Exp Immunol* 2002;128:548-54.

Hudnall SD, Ge Y, Wei L, Yang N, Wang H, Chen T. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Modern Pathol* 2005;18:519-27.

Idesawa M, Sugano M, Ikeda K, Oshikawa M, Takane M, Seki K, et al. Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real time PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:230-2.

Ikuta K, Hoshikawa Y, Sairenji T. Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Microbes Infect* 2000;2:115-20.

Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa RN et al. The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000;191:927-36.

Izadpanah A, Dwinell MB, Feckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3 α CCL20 production by intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* 2001;280:G710-9.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press; 2005.

Javala LR, Rosenberg SA. CD4⁺CD25⁺ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 2003;26:85-93.

Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: A cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol* 2006;34:399-406.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunol* 2007;121:1-14.

Kimsey TF, Campbell AS, Albo D, Willson M, Wang TN. Co-localization of macrophage inflammatory protein-3 α (MIP3 α) and its receptor, CCR6, promotes pancreatic cancer cell invasion. *Cancer J* 2004;10:374-80.

Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, Ishiwata T, Maruyama H, Friess H, et al. Detection and localization of MIP-3 α /LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1999;81:650-7.

Klenerman P, Hill A. T cells and viral persistence: Lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 2005;6:873-9.

Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, et al. The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol Today* 1992;13:219-24.

Kuppers R, Klein U, Schwering I, Distler V, Brauninger A, Cattoretti G et al. Identification of Hodgkin and Red Stemberg-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* 2003;111:529-37.

Kusmartsev GD. Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:323-31.

Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3 α (MIP3- α) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51:818-26.

Ládanyi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejös Z, Mohos A et al. Density of DC-LAMP+ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor *Cancer Immunol, Immunoth* 2007; 56:1459-69.

Lau KM, Cheng SH, Lo KW, Lee SAKW, van Hasselt CA, Lee SP, et al. Increase in circulating FOXP3+CD4+CD25 high regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2007;96:617-22.

Lilly EA, Cameron JE, Shetty KV, Leigh JE, Hager S, McNulty KM, et al. Lack of evidence for local immune activity in oral hairy leukoplakia and oral wart lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:154-62.

Lin JC, Wang WY, Chen KY, Wei YH, Liang WM, Jan JS, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 2004;350:2461-70.

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumour microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756-61.

Macleod RI, Long LQ, Soames JV. Oral hairy leukoplakia in an HIV-negative renal transplant patient. *Br Dent J* 1990;169:208-9.

Maggio E, van der Berg A, Diepstra A, Kluiver J, Visser L, Poppema S. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Annals Oncol* 2002;13(Suppl.1):52-6.

Mahnke K, Bedke T, Enke AH. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell Immunol* 2007;250:1-13.

Mahnke K, Knop J, Enk AH. Induction of tolerogenic DCs: "you are what you eat". *Trends Immunol* 2003;24:646-51.

Mainou BA, Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J Virol* 2006;80:6458-68.

Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004;103:1755-62.

Maruo S, Yang L, Takada K. Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *J Gen Virol* 2001;82:2373-83.

Masmoudi A, Toumi N, Khanfir A, Kallel-Slimi L, Daoud J, Karray H, et al. Epstein-Barr virus-targeted immunotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2007;33:499-505.

Matsui T, Akahoshi T, Namai R, Hashimoto A, Kurihara Y, Rana M, et al. Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP3 α in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2001;125:155-61.

Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, Schlenke P, Hennig H, Steinhoff J, et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5419-28.

Miller DR, Heard PL, Cagle MP, DiMaio D, Ench Y, Morrison DG, et al. Absence of a reservoir of Epstein-Barr virus (EBV) in normal tongue epithelium. *J Oral Pathol Med* 1994;23:156-60.

Miranda C, Lozada-Nur F. Oral hairy leukoplakia in na HIV-negative patient with systemic lupus erythematosus. *Compend Contin Educ* 1996;17(4):408-12.

Monti P, Leone BE, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V, et al. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. *J Immunol* 2004;172:7341-9.

Mutyambizi K, Berger CL, Edelson RL. The balance between immunity and tolerance: The role of Langerhans cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:831-40.

Nagata Y, Inoue H, Yamada K, Higashiyama H, Mishima K, Kizu Y, et al. Activation of Epstein-Barr virus by saliva from Sjogren's syndrome patients. *Immunol* 2004;111:223-9.

Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, Horikawa T, Kawasaki H, Hieshima K, et al. Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α /CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *Int Immunol* 2001;13:95-103.

Ohshima K, Karube K, Hamasaki M, Tutiya T, Yamaguchi T, Saefugi H et al. Differential chemokine, chemokine receptor and cytokine expression in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative diseases. *Leuk Lymphoma* 2003;44(8):1367-78.

Ou SH, Zell JA, Ziogas A, Anton-Culver H. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in the United States: improved survival of Chinese patients within the keratinizing squamous cell carcinoma histology. *Ann Oncol* 2007;18:29-35.

Pak MW, To KF, Lo YM, Chan LY, Tong JH, Lo KW et al. Nasopharyngeal carcinoma in situ (NPCIS)-pathologic and clinical perspectives. *Head Neck* 2002;24:989-95.

Pathamanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 1995;333:693-8.

Pathmanatham R, Prasad U, Chandrika G, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx. Variants of Epstein-Barr virus-infected neoplasia. *Am J Pathol* 1995;146:1355-67.

Pegtel DM, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol* 2004;78(22):12613-24.

Perez-Ordoñez B. An Update on Epstein-Barr Virus and Nasopharyngeal carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2007;1:141-5.

Perry M, Whyte A. Immunology of the Tonsils. *Immunol Today* 1998;19(9):414-21.
Poppema S, Potters M, Emmens R, Visser L, van der Berg A. Immune reactions in classical Hodgkin's lymphoma. *Sem Hematol* 1999;36:253-9.

Pries R, Nitsch S, Wollemberg B. Role of cytokines in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:1195-203.

Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 1986;47:883-9.

Raab-Traub N, Webster-Cyriaque. Epstein-Barr virus infection and expression in oral lesions. *Oral Dis* 1997;(3 Suppl 1):S164-S70.

Raab-Traub N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol* 2002;12:431-41.

Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:267-96.

Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In: *Fields Virology*. 3^a ed. Philadelphia: Lippincott – Raven; 1996.

Rivera H, Nikitakis NG, Castillo S, Siavash H, Papadimitrou JC, Sauk JJ. Histopathological analysis and demonstration of EBV and HIV p-24 antigen but not CMV expression in labial minor salivary glands of HIV patients affected by diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome. *J Oral Pathol Med* 2003;32:431-7.

Roughan JE, Thorley-Lawson DA. The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center. *J Virol* 2009;83(8):3968-76.

Sandvej K, Krenacs L, Hamilton-Dutoit SJ, Rindum JL, Pindborg JJ, Pallesen G. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in oral hairy leukoplakia. *Histopathol* 1992;20:387-95.

Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003;98:1089-99.

Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2005;92:913-20.

Schmidt-Westhausen A, Gelderblom HR, Neuhaus P, Reichart PA. Epstein-Barr virus in lingual epithelium of liver transplant patients. *J Oral Pathol Med* 1993;22:274-6.

Schuttyser E, Struyf S, van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:409-26.

Seymour PA, Thomason JM, Nolan A. Oral lesions in organ transplant patients. *J Oral Pathol Med* 1997;26:297-304.

Shimizu Y, Murata H, Kashii Y, Hirano K, Kunitani H, Higuchi K, et al. CC-chemokine receptor 6 and its ligand macrophage inflammatory protein 3 α might be involved in the amplification of local necroinflammatory response in the liver. *Hepatology* 2001;34:311-9.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-96.

Teo CG. Viral infections in the mouth. *Oral Dis* 2002;(8 Suppl 2):88-90.

Thorley-Lowson DA, Gross A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 2004;350:1328-37.

Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13:143-54.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8:523-32.

Walling DM, Etienne W, Ray AJ, Flaitz CM, Nichols CM. Persistence and transition of Epstein-Barr virus genotypes in the pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis* 2004b;190:387-95.

Walling DM, Flaitz CM, Nichols M. Epstein-Barr virus replication in oral hairy leukoplakia: response, persistence, and resistance to treatment with valacyclovir. *J Infect Dis* 2003;188:883-90.

Walling DM, Flaitz CM, Nichols CM, Hudnall SD, Adler-Storhz K. Persistent productive Epstein-Barr virus replication in normal epithelial cells in vivo. *J Infect Dis* 2001;184:1499-507.

Walling DM, Flaitz K, Hosein FG, Montes-Walters M, Nichols CM. Effect of Epstein-Barr virus replication on Langerhans cells in pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis* 2004a;184:1656-63.

Walling DM, Ling PD, Gordadze AV, Montes-Walters M, Flaitz CM, Nichols CM. Expression of Epstein-Barr virus latent genes in oral epithelium: determinants of the pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis* 2004c;190:396-9.

Wang J, Li J, Hong X, Tang W, Hu X, Wang B, et al. Retrospective case series of gemcitabine plus cisplatin in the treatment of recurrent and metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 2008;44:464-70.

Wingate PJ, McAulay KA, Anthony IC, Crawford DH. Regulatory T cell activity in primary and persistent Epstein-Barr virus infection. *J Med Virol* 2009;81:870-7.

Wojas K, Tabarkiewicz J, Jankiewicz M, Rolinski J. Dendritic cells in peripheral blood of patients with breast and lung cancer – a pilot study. *Folia Histochem Cytobiol* 2004;42:45-8.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumours from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61:4766-72.

Xiao-Feng Qin F. Dynamic behavior and function of Foxp3⁺ regulatory T cells in tumor bearing host. *Cell Mol Immunol* 2009;6(1):3-13.

Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4⁺ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;107:3639-46.

Yip WK, Abdullah MA, Yusoff SM, Seow HF. Increase in tumour-infiltrating lymphocytes with regulatory T cell immunophenotypes and reduced ξ -chain expression in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Exp Immunol* 2009;155:412-22.

Yoshie O, Imai T, Nomiyama H. Chemokines in immunity. *Adv Immunol* 2001;78:57-110.

Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003;22:5108-21.

Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4:757-68.

Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvak J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001;7:1339-46.