JOSÉ HENRIQUE FEIJÓ ROSSETO

**Quantificação do Epstein-Barr Vírus (EBV) em sangue e saliva de
pacientes soropositivos para o HIV, e sua relação com a
Leucoplasia Pílosa**

São Paulo

2010

JOSÉ HENRIQUE FEIJÓ ROSSETO

**Quantificação do Epstein-Barr Vírus (EBV) em sangue e saliva de
pacientes soropositivos para o HIV, e sua relação com a
Leucoplasia Pilosa**

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

Área de Concentração: Patologia
Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Karem
López Ortega

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rosseto, José Henrique Feijó

Quantificação do Epstein-Barr Vírus (EBV) em sangue e saliva de pacientes soropositivos para o HIV, e sua relação com a Leucoplasia Pilosa / José Henrique Feijó Rosseto; orientador Karem López Ortega. -- São Paulo, 2010.

108p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Herpesvirus 4 humano – Pacientes soropositivos. 2. Leucoplasia pilosa – Pacientes soropositivos. 3. Saliva – Carga viral. 4. Sangue – Carga viral. 5. Patologia bucal. I. Ortega, Karem López. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rosseto JHF. Quantificação do Epstein-Barr vírus (EBV) em sangue e saliva de pacientes soropositivos para o HIV e sua relação com a Leucoplasia Pílosa [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2010.

São Paulo,   /   /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A Deus, que dá o ser, o viver, e o mover, obrigado por me sustentar em cada passo que dou. *Gratias tibi Domine!!*

Aos meus pais, José e Rosa, por todo amor, carinho, e apoio incondicional, não somente durante este trabalho, mas no decorrer de toda a minha vida. Sem vocês nunca teria conseguido. Vocês são os mais bem acabados exemplos de pai e de mãe que se doam totalmente e sem reservas aos filhos. Obrigado pelo infatigável esforço feito por vocês, para que eu tivesse a melhor educação possível. Amo vocês de todo meu coração!!

Aos meus irmãos, Elaine, Andréia e Fábio, por todo o amor e carinho, e por terem me dado todo incentivo do mundo durante esta jornada. Sou muito feliz por tê-los como irmãos! Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Karem López Ortega, agradeço por todo o conhecimento transmitido durante esse período. Agradeço ainda pelo crescimento proporcionado por todas as sugestões, críticas e correções que recebi que certamente farão com que eu seja um profissional melhor. Agradeço por toda confiança que você teve em mim durante esse trabalho, isso me deu muita segurança para realizar as coisas com tranquilidade. Obrigado, especialmente, pela sua amizade!

À Profa. Dra. Marina Magalhães, modelo de docente e pesquisadora, obrigado por ter sido a primeira pessoa a acreditar em meu potencial, por ter sido minha orientadora durante o período de iniciação científica, pelo incentivo para que fizesse o mestrado, e por todo o apoio durante a execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Claudio Sergio Pannutti, obrigado por ter me recebido no Instituto de Medicina Tropical, e por ter aberto as portas do laboratório de virologia, sem o qual, não teria sido possível a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Bráz, agradeço por ter me dado a honra de aceitar compor minha banca. Ao colega Paulo, obrigado por todas as dicas sobre hibridização, por sua amizade e pelas conversas que tivemos, inclusive aquelas no aperto do ônibus pelas manhãs.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal: Suzana, Décio, Fábio, Marília e Andrea, por todo o aprendizado que tive convivendo com vocês.

À Adriana Tateno, do IMT, por ter-me cedido a padronização de sua técnica, para a realização das reações de PCR RT, obrigado.

À minha amiga Ana Carolina Mamana, por ter-me ensinado as técnicas de extração, de PCR, e por toda ajuda com a interpretação desses resultados, obrigado. Muito obrigado ainda pelos momentos de risada e diversão no laboratório, você é uma pessoa incrível, te adoro!

À Dani, estagiária do IMT, pela companhia e ajuda, obrigado!

Ao amigo Ronald, companheiro das manhãs de coleta no Cape, obrigado por sua companhia divertida e espirituosa, e por toda a ajuda que você me deu, *muchas gracias* !

À minha querida amiga Karin, por todos esses anos de convivência e amizade, agradeço de coração. Você é uma pessoa iluminada, gosto muito de você !

Aos amigos da patologia, Aluana, Fernando, Felipe Daltoé, Márcio, Fabiana, Carla, Ju Noguti, Nelise, Fabio Coracin, Vanesa, Ana Claudia, Claudia, Érika, obrigado pelo divertido convívio e amizade.

A todos os colegas da disciplina de patologia bucal, obrigado pelo tempo de frutuosa convivência. Aos meus colegas do Cape, Mario Sérgio, Marco, Raul, Setsuko, Fernanda, obrigado pelo convívio.

À Tatiane Nishimura, obrigado pelas risadas, conversas e pela sua amizade.

Às funcionárias do Cape Cris, Jeane, Gil, Sandra, Bel, Marlene, Néia e Andressa, obrigado pelo carinho e pela amizade.

Um agradecimento as funcionárias da patologia Zilda, Néia, Nair, Elisa, Bia, Adriana e Edna, obrigado por toda ajuda.

Um agradecimento especial ao Juvani pela ajuda com as reações de hibridização.

Agradeço aos funcionários do IMT, em especial ao Luciano, extremamente competente e cortês por toda ajuda com a compra dos materiais, e pelo cuidado com o armazenamento das minhas amostras.

Agradeço as funcionárias da biblioteca Vânia, Glauci, Cláudia e Solange pela ajuda com a normalização. Ritinha, Marlene e Sueli: muito obrigado por todo o carinho que recebi de vocês durante todos esses anos em que nos conhecemos.

Agradeço à FAPESP pelo financiamento deste trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento da Pesquisa (CNPq).

Agradeço aos pacientes do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da USP, pela generosa doação de si mesmos para que pudéssemos realizar este trabalho e contribuir para a construção do conhecimento.

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade”

Santo Agostinho

Rosseto JHF. Quantificação do Epstein-Barr Vírus (EBV) em sangue e saliva de pacientes soropositivos para o HIV.e sua relação com a leucoplasia pilosa. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2010.

RESUMO

O Epstein-Barr Vírus (EBV) é um vírus da família Herpes (HHV-4), presente em grande parte da população mundial. É o agente etiológico da mononucleose infecciosa e da leucoplasia pilosa. A leucoplasia pilosa é uma doença epitelial benigna associada ao EBV, caracterizada pela reprodução replicativa do EBV nas células do epitélio oral, e é uma das mais freqüentes lesões oportunistas em pacientes HIV positivos, sendo menos freqüente apenas que a candidíase, com uma prevalência média entre 10 % e 30%. Por ser uma lesão oportunista bucal fortemente relacionada com a infecção pelo HIV e com a imunossupressão, seu diagnóstico é importante, pois pode sugerir o diagnóstico da infecção em pacientes de sorologia desconhecida para o HIV, e auxiliar no estadiamento da doença. Sua detecção e correto diagnóstico são de particular importância por essa condição estar relacionada à capacidade imune do paciente. Além disso, em pacientes já diagnosticados, ela é indicadora da progressão da doença e da eficácia da terapia antirretroviral.

O objetivo desse estudo foi avaliar a presença e a quantidade do EBV na saliva e no sangue de pacientes infectados pelo HIV atendidos no CAPE-FOUSP, verificar a presença clínica de leucoplasia pilosa, estabelecendo a possibilidade da existência de vínculo entre a carga viral do EBV, a manifestação clínica da lesão e a carga viral do HIV. Também se buscou estabelecer relação entre o tipo de terapia antirretroviral em uso e a presença de leucoplasia pilosa, bem como estabelecer relação entre a carga viral do EBV na saliva e no sangue. Foram analisadas 20 lesões de leucoplasia pilosa, num total de 94 pacientes avaliados. Foi encontrada uma correlação positiva entre a Carga Viral do EBV no sangue e na saliva ($p=0,001$). Quanto maior a carga viral no sangue, maior a carga viral na saliva. Foi encontrada associação entre a Carga Viral do EBV na saliva e a presença de Leucoplasia Pilosa ($p=0,045$). Indivíduos com

Leucoplasia Pilosa apresentam maior Carga Viral de EBV na saliva do que indivíduos sem essa lesão. Foi encontrada uma correlação positiva entre a Carga Viral do HIV e a Carga Viral do EBV na saliva ($p=0,006$) porém não no sangue. Quanto maior a carga viral de HIV, maior a carga viral do EBV na saliva. Foi encontrada correlação positiva entre a Carga Viral do EBV no sangue e as contagens de CD4 mais baixa registrada e a mais atual ($p=0,028$ e $p=0,030$ respectivamente). Quanto maior Carga Viral do EBV no sangue, maior a contagem de CD4. Não foi encontrada associação entre o tipo de medicação antirretroviral em uso e presença de lesão de leucoplasia pilosa.

Palavras-chave: Epstein-Barr Vírus (EBV). Leucoplasia Pilosa. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). PCR Real Time.

Rosseto JHF. Quantification of Epstein Barr Virus (EBV) in blood and saliva in HIV seropositive patients and its relation with oral hairy leukoplakia. [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2010.

ABSTRACT

The Epstein-Barr Virus (EBV) is a herpes virus family (HHV-4), is present in great part of the world population. It is the causative agent of infectious mononucleosis and oral hairy leukoplakia. Oral hairy leukoplakia is a benign epithelial disease associated with EBV, which is characterized by the replicative reproduction of EBV in oral epithelial cells, and is one of the most frequent opportunistic lesions in HIV positive patients, only less frequent than candidiasis, with an average prevalence between 10% and 30%. Being an opportunistic oral lesion strongly associated with HIV infection and immunosuppression, its diagnosis is important, because it may suggest the diagnosis of infection in patients of unknown HIV serology, and assist in the staging of the disease. Its detection and correct diagnosis are particularly important because this condition is related to the patient's immune capacity. Moreover, in patients already diagnosed, it is indicative of disease progression and effectiveness of antiretroviral therapy. The aim of this study was to evaluate the presence and quantity of EBV in saliva and blood of HIV-infected patients treated at the CAPE-FOUSP, verifying the presence of clinical OHL, establishing the possibility of the existence of a link between viral load and EBV, clinical manifestation of the lesion, and HIV viral load. It was also aimed to establish the relationship between the type of antiretroviral therapy in use and the presence of oral hairy leukoplakia, as well as establish the relationship between viral load of EBV in saliva and blood. We analyzed 20 lesions of oral hairy leukoplakia, a total of 94 patients. Found a positive correlation between viral load of EBV in blood and saliva ($p = 0.001$). The higher the viral load in blood, the higher the viral load in saliva. Association was found between viral load of EBV in saliva and the presence of oral hairy leukoplakia ($p = 0.045$). Individuals with oral hairy leukoplakia have a higher viral load of EBV in saliva than those without such

injury. Found a positive correlation between viral load and HIV viral load of EBV in saliva ($p = 0.006$) but not in blood. The higher the viral load of HIV, the higher the viral load of EBV in saliva. A positive correlation was found between viral load of EBV in blood and CD4 counts the lowest recorded and most current ($p = 0.028$ and $p = 0.030$ respectively). The higher viral load of EBV in blood, increased CD4 count. No association was found between the type of antiretroviral medications in use and presence of oral hairy leukoplakia lesions.

Keywords: Epstein-Barr Virus (EBV). Oral Hairy Leukoplakia. Human Immunodeficiency Virus (HIV). Real Time PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Distribuição dos pacientes quanto à classificação CDC.....	50
Tabela 5.2	Utilização de antirretrovirais e composição do esquema terapêutico atual dos pacientes HIV+.....	52
Tabela 5.3	Distribuição dos valores de contagem de linfócitos CD4 na população analisada.....	53
Tabela 5.4	Análise descritiva da população estudada.....	54
Tabela 5.5	Correlação entre a presença a carga viral do EBV no sangue e a carga viral do EBV na saliva dos pacientes.....	54
Tabela 5.6	Correlação entre a presença a carga viral do EBV no sangue e na saliva com a carga viral do HIV.....	55
Tabela 5.7	Tabela 5.7 – Relação entre a carga viral do EBV no sangue e na saliva com os níveis de CD4.....	55
Tabela 5.8	Relação entre a carga viral do EBV no sangue e na saliva com o tipo de terapia antirretroviral.....	55
Tabela 5.9	Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e o sexo dos pacientes.....	60
Tabela 5.10	Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e a classificação segundo o CDC (diagnóstico de AIDS) dos pacientes.....	60
Tabela 5.11	Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e o uso de tabaco pelos pacientes.....	60
Tabela 5.12	Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e as variáveis quantitativas dos pacientes.....	61

Tabela 5.13 Associação entre carga viral do EBV na saliva e no sangue e presença ou ausência de leucoplasia pilosa.....	61

Tabela 5.14 - Associação entre histórico de LP e carga viral do EBV na saliva.....	62

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZT	Zidovudina
BCL-2	B cell lymphoma protein 2
CD	cluster of differentiation (denominação de diferentes receptores presentes nas superfícies dos linfócitos)
CDC	Center Disease Control – Centro de controle de doenças
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EBER	Epstein-Barr encoded RNA (sequência de RNA não codificada do EBV)
EBNA	Epstein-Barr nuclear antigen (antigen nuclear do virus Epstein-Barr)
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiametinetetracético
gp	glicoproteína
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy (Terapia antirretroviral altamente ativa)
HE	Hematoxilina e eosina
HHV-4	Herpes Vírus Humano 4
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HLA	Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)
IF	Inibidor de Fusão
Ig	Imunoglobulina
II	Inibidor da integrase
IP	Inibidor de Protease
IRIS	Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome (Síndrome da reconstituição imune inflamatória)
ITRN	Inibidor da transcriptase reversa nucleotídeo
ITRNN	Inibidor da transcriptase reversa não nucleotídeo
LMP	Latent Membrane Protein (Proteína de membrana do ciclo latente)
LPO	Leucoplasia Pilosa Oral
PCR RT	Polimerase Chain Reaction Real Time (Reação de polimerase em cadeia em tempo real)

LISTA DE SÍMBOLOS

cm ³	centímetro cúbico
°C	graus Celsius
g	unidade de medida de rotação
μl	microlitro
mM	mili molar
mm ³	milímetro cúbico
nacl	cloreto de sódio
ph	potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Epstein Barr Vírus	21
2.1.2 Quantificação do EBV por meio da técnica de PCR RT	28
2.2.Leucoplasia Pilosa	32
2.2.1 Epidemiologia	35
2.2.2 Diagnóstico e tratamento	37
2.2.3 Incidência	38
2.2.4 Importância do diagnóstico	39
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Desenho do estudo	42
4.2 Casuística	42
4.3 Critérios de inclusão	42
4.4 Critérios de exclusão	43
4.5 Exame clínico	43
4.5.1 Anamnese	43
4.5.2 Exame físico	43
4.6 Exames complementares	44
4.6.1 Coleta de amostras salivares	44
4.6.2 Coleta de amostras de sangue	44
4.6.3 Biópsia	45
4.7 Exames de biologia molecular	45
4.7.1 Extração de DNA	45
4.7.2 PCR-RT (Syber-Green)	46
4.7.3 Hibridização <i>in situ</i>	47
4.8 Análise estatística	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Análise da população estudada	50

5.2 Análise de correlação entre presença de LP e as outras variáveis em estudo	59
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE	101
ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO

O Epstein-Barr (EBV) foi descoberto em 1964, em indivíduos africanos com linfoma de Burkitt, através da cultura de células de linfócitos B dos mesmos (Epstein et al., 1964). Ele tem sido intimamente associado ao desenvolvimento de diversas doenças malignas, como o Linfoma de Hodgkin, o Linfoma de Burkitt e o carcinoma nasofaríngeo (Thorley-Lawson; Gross, 2004; Rickinson, Kieff, 2007). É também comprovadamente o agente etiológico da Mononucleose Infecciosa e da Leucoplasia Pílosa (Epstein et al., 1964; Greenspan et al., 1984).

A leucoplasia pílosa foi descrita em 1984, por Débora Greenspan, que observou, em um grupo de pacientes homossexuais masculinos, HIV positivos norte-americanos, lesão branca, não removível à raspagem, geralmente localizada na borda lateral da língua (Greenspan et al., 1984). A doença é caracterizada pela replicação produtiva do EBV na superfície das células epiteliais (Webster-Cyriaque et al., 1997).

Lesões orais causadas por patógenos oportunistas são por excelência bons indicadores do estado de imunidade. Num indivíduo imunocomprometido, o complexo meio ambiente da cavidade oral representa um desafio ao controle seletivo desse herpes vírus, que infecta essa estrutura, e sobre suas reativações significativas. O declínio dos linfócitos TCD4 em indivíduos infectados com o HIV-1 torna muito mais susceptível à infecção por uma grande variedade de patógenos orais (Patton et al., 1998).

A presença do DNA do EBV nas camadas basal e parabasal das células da língua, bem como a localização das proteínas associadas à latência nessas mesmas camadas, sugerem que a leucoplasia pílosa em indivíduos soropositivos para o HIV pode representar a reativação da infecção latente, acompanhada por um considerável aumento do número de cópias na camada mais superficial (Webster-Cyriaque et al., 1997). A leucoplasia pílosa tornou-se

um valioso meio de estudo para a observação da ação viral como indutor da proliferação celular, uma vez que nesta fase há a expressão de quase todos os genes e proteínas codificados pelo seu genoma, tanto os expressos na fase latente quanto os expressos na fase lítica (Gulley et al., 2001; Lopez et al., 2003).

A carga viral do EBV tem sido quantificada para relacionar seus níveis, tanto em sangue, quanto em saliva, com doenças associadas ao EBV em pacientes transplantados, com desordens linfoproliferativas e soropositivos para o HIV (Larouche et al., 1995; Stevens et al., 1999; Salimi et al., 2002; Fan et al., 2005; Bonnet et al., 2006; Imbronito et al., 2008)

Com o advento da terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy), na segunda metade da década de 1990, houve uma redução nas lesões bucais associadas ao HIV, entre elas a leucoplasia pilosa (Coogan et al., 2005). Alguns autores também acreditam que mudanças já podem ser sentidas no curso clínico e nas características clínicas dessas lesões (Reichart, 2006; Ortega et al., 2008; Ortega et al., 2009).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPSTEIN-BARR VÍRUS

Existem dois diferentes tipos de EBV: o EBV -1 e o EBV-2, que se diferenciam com base no polimorfismo dos genes que codificam os antígenos nucleares EBNA-2, EBNA-3A, 3B e 3C (Sample et al., 1990). *In vitro*, ambos os genótipos apresentam diferentes propriedades biológicas, refletidas na reduzida capacidade de transformação e no aumento da capacidade lítica do EBV-2 (Buck et al., 1999; Sculley et al., 1999; Correa et al., 2007). O tipo 1 seria, de acordo com estudos epidemiológicos, o de maior prevalência nas populações asiáticas e caucasianas, e o tipo 2 seria prevalente na África (Zimber et al., 1986). Já os pacientes infectados pelo HIV seriam infectados pelos dois tipos de EBV (Walling et al., 2003). Ambos os tipos podem agir como agentes patogênicos em humanos (Rickinson et al., 1987).

O EBV tem como alvo dois tipos de células: os linfócitos B e as células epiteliais. A fixação do EBV no linfócito e sua posterior penetração por endocitose é facilitada por uma glicoproteína presente no envelope viral, denominada gp 350. A glicoproteína se liga ao receptor CD21 (molécula de superfície da célula B, envolvida na ativação desta) competindo com o componente c3d do complemento (Cohen, 2000; Young; Rickinson, 2004). Após a entrada por fusão com a membrana da célula B, pode se desenvolver uma infecção latente ou lítica. Na infecção latente, o genoma do EBV permanece dentro do núcleo sob a forma de um episomo. Na infecção lítica, o DNA do EBV incorpora-se ao genoma do linfócito, sendo transcrito e replicado no núcleo. Os RNAs mensageiros virais são, então, traduzidos no citoplasma. Muitos produtos desta tradução retornam para o núcleo, onde há produção de proteínas virais e montagem do nucleocapsídeo. Os capsídeos adquirem um envelope da lamela externa da membrana nuclear, havendo posteriormente a lise do linfócito e a liberação dos virions (Pegtél et al., 2004; Rickinson; Kieff, 2007).

Apesar da inflamação e da capacidade de crescimento das células linfoblastoides, a maior parte dos indivíduos infectados controla o vírus eficientemente, e permanece livre de doenças associadas ao EBV. Como é necessário tempo para desenvolver resposta imune antígeno-específica, o sistema imune inato, como as citocinas e as células natural killer (NK), são importantes na fase inicial do processo infeccioso do EBV (Williams et al., 2005). Na fase da imunidade adquirida, linfócitos T CD3 e TCD8 constituem as células de defesa fundamentais contra a infecção lítica do EBV. Linfócitos T citotóxicos controlam a infecção através do reconhecimento de pequenos peptídeos derivados da avaria intracelular causados pelas proteínas virais e apresentados na superfície das células infectadas pelas moléculas MHC classe I. Todos os EBNAs (exceto EBNA-1) e os LMPs são alvos dos linfócitos T citotóxicos. Para contornar a resposta imune mediada pelas células T, o EBV utiliza a latência nas células B de memória para permanecer durante a vida do indivíduo (Slots et al., 2006), que desenvolve anticorpos da classe IgG específicos (Fachiro et al., 2004; Goldenberg et al., 2004).

O ciclo de vida do EBV envolve dois compartimentos: o sangue periférico e a cavidade oral. Os linfócitos B de memória infectados pelo EBV latente circulam no sangue periférico, e acredita-se esse seja o principal reservatório do EBV. Já saliva é a principal via de transmissão do EBV, que quando é transmitido dessa forma, pode infectar tanto as células escamosas do epitélio quanto os linfócitos B em repouso, localizados próximos ou na superfície do epitélio tonsilar ou outros órgãos próximos ao anel de Waldeyer. Os diferentes estágios de infecção do EBV, assim como a contribuição dos diferentes genes virais e proteínas na infecção celular e na incubação por longos períodos em indivíduos saudáveis, tem sido objeto de diversos estudos (Rickinson et al., 1987, Young; Murray, 2003; Lacoste et al., 2010). Linfócitos infectados pelo EBV são vistos em linfomas de Burkitt, e também em linhagens celulares linfoblastoides de crescimento contínuo derivadas de linfócitos B periféricos transformados (Thorley-Lawson; Gross, 2004; Rickinson; Kieff, 2007). É possível que isso ocorra em células B da mucosa oral, a partir de evidências das lesões replicativas do vírus vistas na mucosa oral em pacientes imunocomprometidos e é provável que envolva também o epitélio orofaríngeo. Ao mesmo tempo, um grande número de células B latentes infectadas aparece

nos tecidos linfoides tonsilares. *In vitro*, tanto as células B de memória quanto as células virgens, aparentam ser igualmente susceptíveis à infecção pelo EBV (Young; Rickinson, 2004).

A infecção pelo EBV ocorre na maioria das vezes na infância, e pode ocasionar, quando sintomática, uma desordem linfoproliferativa benigna autolimitante conhecida como mononucleose infecciosa, resultado da infecção primária do EBV caracterizada pela expansão dos linfócitos B nos tecidos linfoides e no sangue, associados com a replicação lítica do vírus na orofaringe. A proliferação das células B e a replicação viral são controladas via resposta das células T CD8 citotóxicas, que são responsáveis pelos sintomas clínicos da mononucleose – febre aguda, dor de garganta, linfonodos cervicais aumentados e doloridos (Crawford, 2001; Fafi-Kramer et al., 2005).

A infecção primária do EBV induz tanto a resposta humoral quanto a resposta celular imune, que controlam, mas não eliminam a infecção. Anticorpos são gerados tanto no ciclo lítico, quanto no ciclo latente, sendo dirigidos contra os receptores do vírus no envelope viral, impedindo a ligação em células B e limitando assim a propagação viral. Já a infecção de células epiteliais pode ser observada nos casos de carcinoma nasofaríngeo, em determinados casos de carcinoma de estômago e, na fase replicativa do vírus, nas lesões de leucoplasia pilosa (Rickinson; Kieff, 2007).

O número de células infectadas pelo EBV permanece baixo e estável durante a vida, numa taxa aproximada de 1 a 50 células EBV positivas por milhão de células B (Thorley-Lawson, 1999; Joseph et al., 2000). Isso reflete o delicado equilíbrio entre a proliferação de células B, controlada pelo EBV, e a resposta imune do hospedeiro, que é caracterizada pela produção de IgG contra regiões do vírus e altos níveis de células T reativas aos ciclos lítico e latente do EBV (Van Grunsven et al., 1994; Young; Rickinson, 2004). Um eventual distúrbio desse equilíbrio, como por exemplo, imunossupressão das células T ou desordens imunológicas, pode levar ao aumento da carga do EBV no sangue (Stevens et al., 2001b). Aumentos das cargas virais do EBV são detectados, por exemplo, em pacientes com linfoma não Hodgkin associado à aids (Laroche et al., 1995; Stevens et al., 2002a; Fan et al., 2005; Bonnet et al., 2006). Cargas virais elevadas também são observadas em aproximadamente 20% dos portadores do HIV assintomáticos, na ausência de morbididades

relacionadas ao EBV (Dehee et al., 2001; Van Baarle et al., 2001; Righetti et al., 2002; Stevens et al., 2002a; Ling et al., 2003; Piriou et al., 2004).

As células infectadas podem expressar dois conjuntos de genes virais, tanto do ciclo lítico quanto do ciclo latente (Kieff; Rickinson, 2007).

Na infecção latente das células B, os genes expressos são fundamentais para a indução e manutenção da proliferação celular e latência viral (Young; Rickinson, 2004). Nove desses genes são descritos na literatura, e são os primeiros a serem expressos no ciclo latente: os antígenos Epstein-Barr nucleares virais: EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, a proteína LP (leader protein) e as proteínas latentes de membrana: LMP-1, LMP-2A, e LMP-2B. Os genes EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3C e LMP-1 são fundamentais para a immortalização *in vitro* das células B, e sob a influência central da proteína transativadora EBNA-2 agem conjuntamente para manter as células em contínua proliferação celular enquanto as fixa na fase de diferenciação linfoblastoide, bloqueando a progressão para a replicação viral lítica na maior parte das células infectadas (Kieff; Rickinson, 2007). As proteínas produzidas pelo EBV interagem com uma variedade de proteínas apoptóticas, citocinas, e transdutores de sinais, promovendo infecção, immortalização e transformação celular (Ribeiro-Silva; Zucoloto, 2003).

Nos tecidos infectados pelo EBV, existem três tipos de latência, a saber: a latência do tipo I refere-se a um espectro muito limitado de expressão de gene viral latente, que são as transcrições do EBER junto com as proteínas EBNA-1 e LMP2A. Esse padrão é encontrado nos linfócitos B de indivíduos portadores saudáveis, e também é característico do linfoma de Burkitt e do carcinoma gástrico. A latência do tipo II é caracterizada pela expressão adicional do LMP-1 e a coexpressão da LMP2B, visto na doença de Hodgkin, linfoma de células T e carcinoma nasofaríngeo. A latência do tipo III refere-se a todo espectro da expressão do gene viral latente, como o visto temporariamente na mononucleose infecciosa aguda e como o visto nas linfoproliferações decorrentes do EBV em pacientes imunocomprometidos. Os genes virais expressos no tipo III incluem as EBNAs, as LMPs, mais o EBER (Gulley, 2001).

O tecido mais exposto à infecção pelo EBV é o epitélio das tonsilas e da nasofaringe, locais nos quais o vírus se reproduz e é excretado na saliva para a

propagação horizontal da infecção de novos hospedeiros (Hadinoto et al., 2009). Após transmissão salivar do EBV, o vírus pode ser encontrado na saliva, indicando um local de infecção produtiva na cavidade oral. No entanto, o local exato da infecção produtiva é controverso, com alguns estudos propondo a infecção inicial das células epiteliais, enquanto outros advogam a infecção direta dos linfócitos B. (Crawford, 2001). Essas células carregam o vírus na forma latente, e há baixo nível de produção, contínua ou intermitente do vírus na saliva (Yao et al., 1985).

Para infectar a maior parte da população mundial, o EBV desenvolveu um método altamente eficiente de se espalhar. Já que a maioria dos vírus infecta e replica-se nas células epiteliais, com fácil acesso ao mundo exterior e ao próximo hospedeiro susceptível, muitos trabalhos afirmam que o EBV também pode ter feito uso dessa estratégia (Sixbey, 1989; Young et al., 1989; Karajannis et al., 1997). Em um estudo com o objetivo de relacionar o papel dos linfócitos B e das células epiteliais na infecção pelo EBV, Faulkner et al. (1999) tentaram estudar a condição do EBV em seis indivíduos com um defeito genético raro (Agammaglobulina ligada ao X,- XLA - que resulta em falta de maturação das células B CR2-expressoras). Nenhum dos pacientes demonstrou evidência do EBV na saliva ou no sangue. Apesar da resposta imune normal das células T na XLA, nenhuma célula T específica para o EBV foi detectada, apesar de tê-la sido em todos os indivíduos do grupo controle EBV soropositivo. Esses resultados sugerem que na ausência de linfócitos B, as células epiteliais não podem proporcionar a infecção primária do EBV. (Faulkner et al., 1999).

As interações do EBV com a célula do hospedeiro têm sido estudadas intensamente no contexto dos diferentes estágios de latência do vírus em células malignas, em doenças linfoproliferativas em pacientes transplantados imunodeprimidos, em células B normais de pacientes com mononucleose infecciosa e indivíduos infectados saudáveis. Além disso, a facilidade com a qual os linfócitos B primários podem ser infectados pelo EBV via receptor CR2 (CD21) e transformados em linhagem de células linfoblastoides (LCL) forneceu um modelo passível de estudo para as relações EBV- células B. A linhagem de

células linfoblastoides apresenta o programa de latência III completo, onde todos os EBNA são produzidos, a partir da transcrição primária de um dos dois promotores principais, Cp ou Wp. Entretanto, após a infecção das células B *in vitro*, o primeiro evento detectável é a expressão do EBNA-LP e do EBNA-2 somente do promotor Wp, horas após a infecção, seguida por dois dias de diminuição na atividade Wp e um aumento das transcrições iniciadas por Cp, EBNA1, 3A, 3B e 3C, além de EBNA-LP e EBNA-2. A transcrição do LMP1, LMP2 e o EBER não-codificado aparecem relativamente tarde, de 2 a 4 dias após a infecção (Shannon-Lowe et al., 2009). O promotor Qp, que é usado para a transcrição do EBNA-1 apenas nos mais restritos estágios de latência I e latência II (no Linfoma de Burkitt e na doença de Hodgkin, respectivamente) normalmente não está ativado durante o estabelecimento da LCL, de células B em cultura (Sternas et al., 1990).

Contrastando com as células B, a interação do EBV com as células epiteliais é relativamente pouco compreendida. Os primeiros estudos mostraram a presença do vírus nas células epiteliais descamadas da orofaringe de pacientes com mononucleose infecciosa, o que foi interpretado como indicação de que a infecção e a replicação do vírus normalmente ocorrem nas células epiteliais antes da infecção das células B (Sixbey et al., 1984). De fato, estudos mais recentes demonstraram a presença do DNA, mRNA, e proteínas em células do epitélio tonsilar de indivíduos saudáveis EBV-positivos (Pegtell et al., 2004), bem como a replicação do EBV tem sido reportada no epitélio da língua normal, sugerindo que a língua possa ser uma fonte para o EBV secretado na saliva (Walling et al., 2001). Outro estudo afirma que em indivíduos imunocompetentes o EBV possui pouca ou nenhuma habilidade para replicar-se nas células epiteliais da língua (Herrmann et al., 2002).

O EBV pode se reproduzir nas células epiteliais na leucoplasia pilosa oral, uma lesão associada à aids que ocorre predominantemente na borda lateral da língua (Greenspan et al., 1985; Niedobitek et al., 1991). Baseado nesses estudos, Herrmann et al. (2002) examinaram o potencial papel das células do epitélio nasofaríngeo na replicação do EBV, através da expressão da proteína BZLF-1, que age como um transativador dos outros genes do ciclo

lítico, e essa proteína é o primeiro marcador da replicação lítica do EBV, e demonstraram a replicação do EBV em quatro das 168 amostras analisadas, reforçando a ideia de que a replicação do EBV no epitélio orofaríngeo não ocorre com frequência, sendo um evento raro. (Herrmann et al., 2002). Esses estudos sugerem que a verdadeira latência das células epiteliais somente é observada em células de tumores epiteliais EBV-positivos, como o carcinoma de nasofaringe e alguns carcinomas gástricos (Smith; Griffin, 1992; Brooks et al., 1992). Na leucoplasia pilosa, modelo de estudo da infecção do EBV em células epiteliais não neoplásicas, o vírus no ciclo replicativo é detectado nas camadas superficiais do epitélio, porém não há expressão de nenhum produto característico da fase latente nas células da camada basal (Herrman et al., 2002; Walling et al., 2004b). Outro estudo buscou examinar o potencial das células epiteliais para replicação vital com amostras de borda lateral de língua de 84 cadáveres, e demonstrou que o epitélio da borda lateral da língua suporta a replicação do EBV, da mesma maneira que o observado na leucoplasia pilosa, em indivíduos com doenças que comprometem o sistema imune, ainda que os autores tenham frisado ser esse um evento não frequente (Herrmann et al., 2002).

Semelhantemente a outros herpesvírus, o EBV evoluiu para coexistir com o seu hospedeiro (Cho et al., 1999). Hospedeiros imunocompetentes provocam uma forte resposta celular T citotóxica contra células infectadas pelo EBV, resposta predominantemente voltada para o controle das células que expressam o programa de latência III, associado com o crescimento ativo da célula (Hislop et al., 2007). A opinião corrente é que um delicado equilíbrio entre os fatores imunes do hospedeiro, a coordenada expressão de genes durante os vários estágios da latência viral e replicação limitada a locais restritos, permite ao EBV manter-se por toda a vida em hospedeiros imunocompetentes, sem causar doença (Thorley-Lawson; 2001; Middeldorp; Pegtel, 2008).

2.1.2 Quantificação do EBV por meio da técnica de PCR-RT

Na literatura, existem diversos trabalhos que utilizam a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), como a PCR em tempo real (PCR RT), para quantificar os níveis virais do EBV nas secreções e no sangue, buscando traçar um paralelo entre carga viral do EBV e a presença de manifestação clínica.

A PCR RT é uma técnica baseada na detecção do produto da amplificação do DNA através da aferição do aumento da fluorescência por uma câmera que identifica amplitudes de 530 a 580 nm. Essa fluorescência é causada pela ligação do SYBR Green (um corante fluoróforo) à dupla fita de DNA, o que causa aumento de emissão de luz até 100 vezes para uma mesma concentração de SYBR Green livre em solução. A intensidade de luz aumenta ao longo do tempo à medida que são gerados os produtos da reação da PCR e que são medidos pelo computador quantificando assim o vírus (Lai et al., 2005).

Segundo Espy et al. (2006), a técnica da PCR-RT reduz os custos laboratoriais, e consome menos tempo. O advento da PCR RT facilitou a quantificação do DNA viral em sangue, saliva e amostras de tecido. Uma técnica bem calibrada de PCR RT é altamente sensível, específica, reprodutível, e com baixo risco de contaminação. A exatidão, precisão e linearidade dos ensaios em tempo real são teoricamente melhores do que com outros métodos (Gulley et al., 2006).

A quantificação do EBV pode relacionar as variações da carga viral ao aparecimento de sintomas clínicos das doenças associadas ao EBV (Ruiz et al., 2005).

Diversos estudos mostraram que a quantidade do DNA do EBV na saliva é elevada em pessoas com desordens linfoproliferativas, transplantados e soropositivos para o HIV (Falk et al., 1997; Hochman et al., 1998; Ikuta et al., 2000; Salimi et al., 2002). A saliva representa um meio fácil de obter amostras contendo agentes infecciosos (Mattos et al., 1998; Darout et al., 2002; Bachrach et al., 2003).

Diversos estudos foram efetuados para determinar a carga viral do EBV nos compartimentos do sangue, incluindo o sangue não fracionado, soro, plasma (Bai et al., 1997; Limaye et al., 1999; Stevens et al., 1999; Lo et al., 1999), leucócitos isolados do sangue periférico (Riddler et al., 1994; Lucas et al., 1998) e células mononucleares (Savoie et al., 1994; Rowe et al., 1997). O sangue total é a amostra preferida por muitos autores por possuir todos os componentes que podem conter o EBV. O sangue total fornece uma medida absoluta da carga viral circulante, independentemente de artefatos devidos ao isolamento da célula, da preparação do soro ou do plasma, bem como de variações na contagem de células (Stevens et al., 2001a; Stevens et al., 2002b).

Estudo de Piriou et al. (2005) analisou as cargas virais de 10 pacientes HIV positivos sob HAART, num período de 5 anos. O objetivo era investigar o efeito da terapia antirretroviral na infecção pelo EBV e a resposta das células CD4 e CD8 específicas para o EBV. Todos os sujeitos do estudo mostraram queda da viremia do HIV, uma restauração dos níveis de linfócitos T CD4 e um declínio na ativação das células T imunes. Apesar disso a carga viral do EBV permaneceu inalterada, ainda que um declínio das células CD4 e CD8 específicas para a proteína lítica do EBV (BZLF-1) sugerissem um decréscimo da taxa de reativação do EBV. Por outro lado, as respostas das células TCD4 e TCD8 ao antígeno EBNA-1 foram restauradas após 5 anos de tratamento a níveis semelhantes aos de indivíduos saudáveis.

Estudo de O'Sullivan et al. (2002) demonstrou a reconstituição imune do EBV através da mensuração da sorologia e da carga viral em pacientes com infecção avançada pelo HIV sob terapia HAART. Foi observado um aumento significativo nos níveis dos anticorpos EBNA e do EA (antígeno precoce do Epstein-Barr) em 17 dos 30 sujeitos da pesquisa. Os autores afirmam que os pacientes que respondem à HAART têm um aumento de seus anticorpos específicos para o EBV, e uma diminuição dos anticorpos específicos para o HIV. Os autores argumentam que mudanças na carga de DNA do EBV podem refletir mudanças no conjunto dos linfócitos B, na replicação lítica do vírus ou uma combinação de mudanças no ciclo latente e lítico do EBV.

Estudo avaliando o efeito da terapia HAART sobre o EBV também foi realizado por Babcock et al. (1999) e demonstrou que a reativação do EBV em

pacientes imunodeprimidos ocorre predominantemente nos linfócitos B de repouso. Também se demonstrou que o aumento de linfócitos T e linfócitos B no sangue periférico de pacientes após o início da terapia HAART reflete mais a redistribuição dessas células que a síntese *de novo* (Bucy et al., 1999). Esses resultados levaram à criação de modelos que explicariam o comportamento dinâmico do EBV em pacientes imunodeprimidos. Um dos modelos afirma que em pacientes com infecção avançada do HIV, o baixo número de linfócitos B limita o número de células que o EBV pode infectar. Após o início da HAART, o número desses linfócitos aumenta, permitindo assim maior replicação do EBV, e aumentando a carga viral do mesmo, efeito que é reduzido pela reconstituição imune que ocorre concomitantemente (O'Sullivan et al., 2002). Outro modelo aventado afirma que os pacientes com infecção pelo HIV possuem baixos níveis de replicação viral. Os linfócitos B infectados pelo EBV são seqüestrados nos linfonodos e, portanto, esses pacientes podem apresentar testes negativos para o EBV no sangue periférico através do exame de PCR. Com a terapia HAART há uma redistribuição inicial desses linfócitos EBV positivos, levando a uma positividade para o EBV no sangue, detectada pelos exames de PCR. Essa positividade é, no entanto, transitória, pois concomitantemente com a redistribuição dos linfócitos ocorre a reconstituição imune tanto da imunidade celular como da imunidade humoral, levando a um controle da reativação do EBV e por fim, uma diminuição na detecção do vírus no sangue periférico (O'Sullivan et al., 2002).

Estudos da resposta imune ao EBV em pacientes HIV também foram realizados por Legoff et al (2004). Um grupo de 72 pacientes teve seus níveis de carga viral do EBV medidos no sangue através da técnica de PCR RT e a imunidade específica medida através de ensaio ELISPOT. Nesse estudo, os níveis circulantes de DNA do EBV foram maiores em indivíduos infectados pelo HIV do que no grupo controle HIV soronegativo, e o nível médio da carga de DNA do EBV foi maior naqueles pacientes com contagem de células T CD4 menor que 350 cél/mm^3 , do que naqueles com maiores taxas de CD4, sugerindo que as células T CD4 não são um marcador relevante capaz de prever o nível de células circulantes associadas ao EBV. Para avaliar se o aumento de células com DNA do EBV estão associadas com o prejuízo da resposta imune das células T CD8 específicas, o grupo estudado por esses

autores foi acompanhado prospectivamente, e foi observada uma relação inversa entre os níveis do EBV e a resposta das células T CD8. Aparentemente, a perda de linfócitos T CD8 EBV específicos em pacientes infectados pelo HIV com baixa contagem de células T CD4 estão associadas com o aumento da carga viral do EBV.

O papel do EBV no desenvolvimento de doenças periodontais levou ao estudo de Idesawa e colaboradores, que compararam a presença do EBV em pacientes com doença periodontal usando a técnica de PCR RT, e mostraram que os níveis virais na saliva diminuíram após início da terapia periodontal, sugerindo um possível papel da inflamação periodontal nos níveis de EBV na saliva (Idesawa et al., 2004).

Já Lin et al. (2004) realizaram um estudo onde compararam a carga viral do EBV no plasma de 99 pacientes com carcinoma de nasofaringe. Relataram entre seus achados que a sobrevida após dois anos do fim da radioterapia entre aqueles pacientes com carga viral persistentemente detectável era de 56.3%, contra um índice de 96.7% daqueles pacientes com carga viral indetectável após o mesmo procedimento. Comparando as taxas de sobrevida sem recidiva após dois anos do fim da radioterapia, os pacientes com carga viral detectável exibiram um índice de 28.6%, contra 84.6% entre aqueles com carga viral indetectável, indicando assim uma possível correlação entre carga viral do EBV e sintomatologia clínica causada pelo mesmo (Lin et al., 2004).

Para Ruiz et al. (2005) a detecção quantitativa do EBV não significa necessariamente correlação com a presença de manifestações clínicas, porém a quantificação da carga viral pode significar um meio de ligar as flutuações da carga com a sintomatologia clínica, monitorando assim as doenças associadas ao EBV.

Estudo de Ling et al. (2003) mediu a carga viral do EBV em saliva e sangue de pacientes soropositivos para o HIV, e comparou os resultados com um grupo controle HIV soronegativo; constatou que os níveis são mais altos em pacientes soropositivos, corroborando outros achados da literatura (Ling et al., 2003). Também notaram a existência de correlação entre taxa de células CD4 e presença do EBV no sangue, sendo maior o número de resultados positivos (entre 90 e 100%) naqueles com carga de contagens de células CD4 abaixo de

500 células/mm³. Porém, as cargas virais do EBV nesses pacientes apresentaram-se elevadas independentemente dos níveis de CD4. Eles afirmam que futuros estudos que avaliem a dinâmica da infecção pelo EBV são necessários, pois as evidências sugerem que há um risco persistente de ocorrer algumas doenças associadas ao EBV nesses indivíduos (Ling et al., 2003).

Esses dados da literatura nos mostram que o EBV desempenha um papel importante em pacientes imunodeprimidos, e que o comportamento do vírus em pacientes soropositivos para o HIV sob terapia HAART ainda precisa ser melhor elucidado, e que a quantificação do EBV por meio de técnicas como a PCR-RT estão entre os métodos mais eficazes e precisos para relacionar quantidade do vírus com manifestações clínicas.

2.2 LEUCOPLASIA PILOSA

A leucoplasia pilosa (LP) é uma doença epitelial benigna associada ao EBV, caracterizada pela reprodução replicativa do EBV nas células do epitélio oral (Greenspan et al., 1985). Clinicamente apresenta-se como uma placa branca, na transição entre os epitélios do dorso e ventre da língua, de superfície lisa ou corrugada, podendo ter extensão variando de poucos milímetros a alguns centímetros. Os aspectos clínicos são característicos, porém não são patognomônicos da lesão (Greenspan et al., 1984; Greenspan et al., 1985; Green et al., 1989; Walling et al., 2003).

O quadro histopatológico revela entre outros achados, presença de células balonizadas nas porções média e superficial da camada espinhosa. Essas células balonizadas são caracterizadas por um núcleo aumentado, hipercromático, envolto por um halo branco de citoplasma (característica da inclusão viral no queratinócito) (Greenspan et al., 1984; Green et al., 1989).

O epitélio da orofaringe e da língua, segundo alguns autores, pode representar sítios de ativação e replicação do vírus, além da infecção latente, e que o EBV infecte estes tecidos a partir do trânsito de linfócitos B do sangue (Walling et al., 2004b).

O diagnóstico da leucoplasia pilosa, de acordo com alguns autores consultados na literatura, pode ser feito apenas com base nas características clínicas, pois as mesmas seriam peculiares o bastante para o diagnóstico, nos casos em que se conhece a soropositividade para o HIV do paciente (Eversole et al., 1986; Schidiot et al., 1987b; Loughrey et al., 2004). Outros autores, porém, afirmam ser o quadro clínico insuficiente para estabelecimento do diagnóstico, sendo necessária a conjunção dos achados clínicos e histopatológicos (Shibosky, 1997).

Por não apresentar um quadro clínico ou histológico patognomônicos, o diagnóstico final da leucoplasia pilosa, segundo uma terceira corrente de autores deve ser feito por meio da Hibridização *in situ* considerada o padrão-ouro para o diagnóstico (Green et al., 1989; Greenspan et al., 1998; Mabruk et al., 1996; Loughrey et al., 2004; Braz –Silva et al., 2006).

O tratamento da lesão se faz através de drogas que inibem a replicação do EBV (Walling et al., 2001), mas o tratamento não elimina a infecção latente pelo EBV, e a replicação oral do vírus frequentemente volta a ocorrer após o término do tratamento (Walling et al., 2001; Walling et al., 2003).

A leucoplasia pilosa é a única doença crônica relacionada ao EBV onde o vírus se replica profusamente, e a intensidade da replicação viral é proporcional ao grau de diferenciação do queratinócito. Grandes quantidades do vírus podem ser detectadas nas camadas superiores do epitélio afetado. Na lesão pode haver múltiplas cepas do EBV que podem sofrer recombinação inter e intra-cepas (Walling et al., 1995). Um aspecto que chama a atenção, é que as células epiteliais suportem tamanha atividade replicativa, permanecendo intactas, enquanto nas infecções típicas por herpesvírus, a abundante proliferação viral resulta na lise das células (Teo, 2002).

Concomitante com a replicação do EBV ocorre a expressão, nos queratinócitos, das proteínas e transcritos do vírus associados com a replicação lítica nos linfócitos B como, por exemplo, a BCRF1, uma potente citocina antiinflamatória, cujos altos níveis de produção podem explicar a falta de resposta inflamatória na leucoplasia pilosa, a e BZLF1, que age como transativadora de outros genes virais do ciclo lítico, induzindo a mudança entre o estado de latência e o de replicação. Além da expressão das proteínas replicativas, os queratinócitos portadores do EBV também expressam proteínas

virais características da infecção latente, como as EBNA: LP 1,2,3B e 3C. Transcrições das proteínas que conferem a alteração das atividades, como a LMP1, LMP2 e a BDLF2 (que é homóloga da ciclina B1), também foram detectadas nos queratinócitos de lesões de leucoplasia pilosa (Young et al., 1999; Teo, 2002).

Aparentemente, tanto as proteínas latentes como as replicativas contribuem para o desenvolvimento da leucoplasia pilosa, induzindo muitas das características histológicas da mesma, com a acantose e a hiperproliferação. A LMP1, por exemplo, induz a expressão da queratina 6, que está associada com a hiperproliferação e com o receptor do fator de crescimento epidermal, que permite aos queratinócitos supra basais manter a capacidade proliferativa depois de submetidos à diferenciação (Young et al., 1999; Webster-Cyriaque et al., 2000; Herrmann et al., 2002; Teo 2002; Walling et al., 2004a). Já a resistência dos coilocitos a lise, apesar da intensa replicação viral, pode ser devido à presença da proteína BHRF1, que é homóloga do oncogene anti-apoptótico Bcl-2 e da LMP1, que, através da ativação da NF-KB, é também anti-apoptótico. (Young et al., 1999). Mesmo com a expressão de genes do ciclo latente, estes só foram expressos nas camadas superficiais do epitélio (Walling et al., 2004b).

Existem três modelos que tentam explicar a passagem do EBV do linfócito B para as células epiteliais da mucosa. O primeiro modelo descreve a produção do EBV nos tecidos linfóides orais, com lançamento de virions na saliva, e posterior infecção de células epiteliais bucais através da superfície do epitélio (Anagnostopoulos et al., 1995; Karajamis et al., 1997; Webster-Cyriaque et al., 1998; Niedobitek et al., 2000; Borza et al., 2002). Um segundo modelo descreve a produção do EBV nos tecidos submucosos e a infecção das células basais epiteliais confinadas em IgA específicos do EBV, que entram por endocitose por receptores de imunoglobulina (Sixbey; Yao, 1992; Gan et al., 1997). Há um terceiro modelo, no qual os linfócitos B contendo o EBV na forma latente migram do sangue diretamente para o epitélio oral (Niedobitek; Young, 1994). Nesse modelo, um linfócito B infectado pelo EBV poderia entrar no epitélio, e transmitir a infecção para a célula epitelial adjacente, quer por um episódio transitório de replicação produtiva e virions ligados aos receptores das células do epitélio oral, quer por transferência direta célula-a-célula do vírus as

células epiteliais (Corso et al., 1989; Sandvej et al., 1992; Thomas et al., 1991; Imai et al., 1998).

Em estudo de Walling e colaboradores (2004a, 2004b) os autores sugeriram que o tecido do epitélio oral seja um reservatório da infecção persistente do vírus, e que há permuta entre a população do EBV presente no sangue e na orofaringe, só que ainda não está claro se isso reflete algum tropismo do tecido epitelial aos diferentes genótipos do EBV ou apenas uma amostra aleatória de um processo dinâmico de troca do EBV entre o sangue e o tecido epitelial oral (Gratama et al., 1988; Sitki-Green et al., 2003; Palefsky et al., 2002; Walling et al., 2003; Walling et al., 2004a, 2004b).

2.2.1 Epidemiologia

Quando foi descrita pela primeira vez, em meados da década de 1980, em homossexuais masculinos, pensou-se tratar de lesão exclusiva de pacientes soropositivos para o HIV (Greenspan et al., 1984). A lesão também foi descrita nas mulheres (Shiboski et al., 1997), sendo pouco observado em crianças (Mannelli et al., 1995). Em 1989, foi relatado o primeiro caso de leucoplasia em um paciente soronegativo para o HIV, um paciente submetido a transplante renal, que fazia uso de imunossupressores (Greenspan et al., 1989), sendo que vários outros trabalhos relataram a presença de leucoplasia em grupos de pacientes HIV soronegativos, mas todos imunodeprimidos, o que levou à associação entre leucoplasia pilosa e imunodepressão (Itin et al., 1988; King et al., 1994).

Os estudos nos anos seguintes demonstraram que a leucoplasia pilosa era mais prevalente em homens que em mulheres (Shiboski et al., 1996). Patton et al. (1998) afirma que os homens têm 4.4 vezes mais chance de desenvolver a leucoplasia pilosa do que as mulheres.

A relação entre a rota de transmissão do HIV e a leucoplasia pilosa é controversa na literatura. Estudo de Patton et al. (2002) verificou ser a leucoplasia pilosa mais prevalente em homossexuais masculinos, enquanto Chattopadhyay et al. (2005) encontrou maior prevalência no grupo dos

bissexuais. Os heterossexuais foram o grupo de maior prevalência para a lesão no estudo de Moura et al. (2006), sendo que essas diferenças entre os trabalhos podem estar relacionadas a questões metodológicas.

O tabaco foi citado como associado à maior prevalência da lesão em alguns trabalhos (Lourenço et al., 2008). Outros, não encontraram essa associação (Gonzalez et al., 2010), bem como afirmam estes autores não encontrarem associação entre etilismo e presença de lesão de leucoplasia pilosa.

Inicialmente, a leucoplasia pilosa foi associada à baixa contagem de linfócitos T CD4 (<200 céls/mm³), como demonstrado por Ramirez-Amador et al. (1996), Begg et al. (1997), Patton et al. (2000), Chattopadhyay et al. (2005). Essa depleção de linfócitos T CD4 seria a responsável pelo aparecimento da leucoplasia pilosa, bem como de outras lesões oportunistas, sendo a presença da lesão em pacientes de sorologia desconhecida um indicativo da necessidade de investigação de infecção pelo HIV (Greenspan et al., 1987; Boulter et al., 1996; Birbaum et al., 2002). Alguns trabalhos demonstraram que indivíduos soropositivos para o HIV que apresentaram leucoplasia pilosa, progrediram mais rapidamente para a aids (Patton et al., 2002; Greenspan; Greenspan, 2002; Coogan et al., 2005). Outros autores não encontraram relação entre os níveis de CD4 e a presença de leucoplasia pilosa (Barr et al., 1992; Logan et al., 2001; Moura et al., 2006).

Em relação a carga viral do HIV e a infecção pelo EBV, estudo de Gonzalez et al. (2010) relatou não haver relação entre ambas, sendo que Tappuni e Fleming (2001) e Bravo et al (2006) reportaram haver maior prevalência de lesão em indivíduos com carga viral do HIV acima de, no mínimo, 3000 cópias/μl.

2.2.2 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico diferencial da leucoplasia pilosa pode ser dar entre as lesões de hiperparaqueratose, morsicatio buccarum, líquen plano e candidíase hiperplásica (Triantos et al., 1997). Por não apresentar um quadro clínico ou histológico patognomônicos, o diagnóstico final da leucoplasia pilosa, segundo alguns autores deve ser feito por meio da Hibridização *in situ* considerada o padrão-ouro para o diagnóstico (Green et al., 1989, Loughrey et al., 2004; Braz-Silva et al., 2006).

A hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir de "sondas" específicas. As sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar (Greenspan et al., 1998). Outras técnicas de biologia molecular como, a técnica da PCR, não é considerada por alguns autores como adequada, pois a PCR apesar de ser altamente sensível, não consegue distinguir o vírus do EBV circulante na saliva daquele presente no interior das células epiteliais, condição essa necessária para que ocorra a leucoplasia pilosa (Mabruk et al., 1996).

A leucoplasia pilosa, por ser uma lesão benigna, sem sintomatologia, e que geralmente apresenta remissão espontânea, não requer tratamento específico, porém, queixas de natureza estética algumas vezes faz com que o paciente solicite algum tratamento da lesão (Greenspan et al., 1990).

Tratamentos sistêmicos para a leucoplasia pilosa poderiam incluir desde antivirais, que interromperiam o ciclo replicativo do EBV, como por exemplo, aciclovir, desciclovir e valaciclovir (Walling et al., 2003), até medicamentos tópicos como podofilina, agente quimioterápico que interfere na replicação celular, ou o ácido retinóico, que, *in vitro*, inibe a replicação viral e induz a diferenciação celular, havendo um estímulo da descamação epitelial (Lozada-Nur; Costa, 1992; Triantos et al., 1997).

Violeta de genciano também foi usado como tratamento das lesões de leucoplasia, pois o violeta de genciano age inibindo o oxigênio reativo, produto gerado na infecção pelo EBV, reação mediada em grande parte pelos oncogenes do EBV, como o LMP-1 (Sulochana et al., 2008).

A terapia com medicação sistêmica, segundo Triantos e colaboradores não deve ser indicada, tendo em vista os efeitos colaterais dos antivirais, e o desenvolvimento de resistência que pode ocorrer no uso de longo prazo dos antivirais, dando-se assim, preferência a tratamentos com medicação de uso tópico (Triantos et al., 1997).

2.2.3 Incidência

Estudos mostram que a leucoplasia pilosa é uma das mais freqüentes lesões oportunistas em pacientes HIV positivos, sendo menos freqüente apenas que a candidíase, com uma prevalência média entre 10 % e 30% (Moniaci et al., 1990; Ceballos-Salobreña et al., 1996; Nittayananta; Chungpanich, 1997; Ranganathan et al., 2000; Baccaglini et al., 2007). Estudo de Moura et al. (2006) relata que a carga viral ≥ 3000 cópias/ μ l, o uso prévio de cetoconazol, bem como o histórico de candidíase são fatores de risco para desenvolver leucoplasia pilosa (Moura et al., 2006).

A partir da introdução da terapia antirretroviral altamente ativa (em inglês, HAART), na segunda metade da década de 1990, a incidência das lesões orais, entre elas, a LP, tem mostrado uma diminuição (Hamza et al., 2006). A terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) é a combinação de ao menos três tipos de drogas, normalmente, incluindo tanto um inibidor de protease ou inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo, e dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo. Eles são administrados simultaneamente para criar um bloco de sustentação contra a replicação viral e restaurar a função do sistema imune bem como minimizar a resistência viral as drogas (Ho, 1995).

A terapia HAART tornou-se tratamento-padrão para a infecção pelo HIV. Ela induz uma acentuada redução da carga viral e um aumento na contagem de linfócitos T CD4 reduzindo a morbidade e a mortalidade em indivíduos HIV - positivos (Li et al., 1998; Lederman, 2001). Antes da introdução dos antirretrovirais, algumas das lesões orais mais comumente

encontradas eram a candidíase e a leucoplasia pilosa (Laskaris et al., 1992; Glick et al., 1994).

Um estudo descreveu o quadro evolutivo da incidência das principais lesões orais em 1596 pacientes HIV +, num período de 16 anos (1989-2006), e registrou uma diminuição da incidência de leucoplasia pilosa, de índices entre 20-25 %, na transição entre as décadas de 1980 para 1990, para índices abaixo de 10% na primeira metade dos anos 2000, e observou uma queda dessas taxas, de forma inconstante e regular, se comparada com a candidíase, sugerindo uma possível resistência da lesão de leucoplasia pilosa à terapia HAART (Ortega et al., 2009). Esse estudo reforça outro realizado por Greenspan et al. (2004), que avaliou um grupo de 506 mulheres soropositivas para o HIV em uso de medicação HAART por um período de 6 anos, e que notou uma diminuição da incidência das lesões orais, exceto das lesões de leucoplasia pilosa, que continuaram nos mesmos níveis (Greenspan et al., 2004).

O Brasil possui, desde 1996, um programa de produção e distribuição de antirretrovirais para todos os indivíduos infectados pelo HIV (Cohen, 2006). A evolução dessa terapia levou a diversas investigações que reportaram uma diminuição na incidência de lesões oportunistas, ou mudanças em seus aspectos clínicos, incluindo-se as lesões orais associadas com a evolução da infecção pelo HIV (Birnbaum et al., 2002; Pulvirenti, 2005).

2.2.4 Importância do diagnóstico

A aids é uma doença causada por um retrovírus que leva à uma imunossupressão profunda, devido à depleção dos linfócitos T CD4, que levam à infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (Kumar et al., 2004).

Manifestações clínicas na cavidade oral são comuns na aids, e entre elas, encontra-se a leucoplasia pilosa. Por ser uma lesão oportunista bucal fortemente relacionada com a infecção pelo HIV e com a imunossupressão, seu diagnóstico é importante, pois pode sugerir o diagnóstico da infecção pelo

HIV em pacientes de sorologia desconhecida, e auxiliar no estadiamento da doença (Birnbaum et al., 2002; Moura et al., 2006).

Sua detecção e correto diagnóstico são de particular importância por essa condição estar relacionada à capacidade imune do paciente. Além disso, em pacientes já diagnosticados, ela é indicadora da progressão da doença e da eficácia da terapia antirretroviral (Walling et al., 2004a).

Estudos mostram que os níveis de EBV no sangue e na saliva são mais altos em pacientes HIV positivos do que os encontrados em pacientes HIV negativos (Diaz-Mitoma et al., 1990; Ling et al., 2003).

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo primário

Estabelecer a possibilidade da existência de vínculo entre a carga viral do EBV (no sangue e na saliva) com a presença de lesões de leucoplasia pilosa

Objetivos secundários

Verificar a correlação entre presença ou não de leucoplasia pilosa em relação à idade, sexo, tempo de soropositividade para o HIV, classificação do CDC, contagem de linfócitos CD4 mais baixa registrada e contagem de linfócitos CD4 atual, carga viral para o HIV, tabagismo e tempo de uso de terapia antirretroviral.

Verificar correlação entre a carga viral do EBV (no sangue e saliva) com CD4 e carga viral do HIV.

Verificar correlação entre a carga viral do EBV na saliva e a carga viral do EBV no sangue.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho de pesquisa foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (parecer 213/2008 FR- 229342 – Anexo A) e pelo Comitê de Ética do Instituto de Medicina Tropical (CEP-IMT 060/2009 – Anexo B).

Os pacientes foram abordados sobre o interesse em participar da pesquisa durante as consultas que realizaram periodicamente no CAPE. Ao aceitarem participar do projeto, receberam uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). O trabalho foi desenvolvido no ambulatório do CAPE, nos laboratórios da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP e no Instituto de Medicina Tropical da USP.

4.1 Desenho do estudo

O presente trabalho constituiu-se num estudo descritivo de corte transversal.

4.2 Casuística

Foram estudados 94 pacientes, soropositivos para o HIV, atendidos no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da USP.

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos no presente estudo pacientes HIV+, atendidos no CAPE-FOUSP, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, independente do uso ou não de terapia ARV.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo quaisquer pacientes com comprometimento cognitivo (que não permitisse a compreensão da anamnese e do TCLE), pacientes em tratamento quimio ou radioterápico e que estivessem fazendo uso de drogas antivirais (para herpes vírus) ou que as tivessem utilizado 3 meses antes da avaliação.

4.5 Exame clínico

Os pacientes foram submetidos a exame clínico completo, constando de anamnese e exame físico. Os dados colhidos foram transferidos para uma ficha clínica desenvolvida para esta pesquisa (anexo II).

4.5.1 Anamnese

Foram colhidos dados referentes à idade, sexo, raça, categoria de exposição ao HIV, co-morbidades ou doenças sistêmicas crônicas, tempo de soropositividade para o HIV, tipo de terapia antirretroviral e tempo de uso da terapia ARV, e contagem de CD4 e carga viral.

4.5.2 Exame físico

O exame físico foi executado em ambulatório odontológico, sob luz artificial, e os pacientes foram submetidos a exame estomatológico para identificação e diagnóstico clínico de manifestações orais oportunistas relativas à infecção pelo HIV.

Os pacientes foram avaliados na cadeira odontológica pelo pesquisador, na busca da presença de LP, de acordo com os critérios

estabelecidos por EC-Clearinghouse (1993): placas brancas, pouco elevadas, não removíveis por raspagem, indolores, de limites imprecisos, superfície lisa ou rugosa, localizando-se preferencialmente na borda lateral da língua, uni ou bilaterais (EC-Clearinghouse, 1993).

O pesquisador foi previamente treinado e calibrado junto à sua orientadora.

4.6 Exames complementares

4.6.1 Coleta de amostras salivares

Foram colhidas amostras salivares de todos os pacientes para que fosse estabelecida a presença e a quantidade de EBV, através do PCR real time.

Para a coleta da saliva, os pacientes foram instruídos a não comer ou escovar os dentes 30 minutos antes do exame. O paciente coletou saliva não estimulada em um coletor estéril, e o coletor foi armazenado num freezer, a temperatura de - 80 °C.

4.6.2 Coleta de amostras de sangue

No momento em que o paciente estava no CAPE, para o seu tratamento rotineiro, foi feita a coleta de sangue por uma enfermeira treinada sendo que o paciente não teve que se deslocar para outro lugar. Foram coletados 5 ml de sangue total que foi armazenado em tubo de coleta de sangue, com o anticoagulante EDTA. Uma vez coletada, estas amostras permaneceram armazenadas entre 2 °C e 8 °C até seu transporte até o Instituto de Medicina Tropical, onde foram realizadas as reações de extração de DNA.

4.6.3 Biópsia

Quando houve suspeita clínica de LP, procedeu-se a realização de biópsia incisional. O material foi fixado em formol a 10% e enviado ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Os cortes histológicos foram emblocados em parafina e corados pela hematoxilina eosina (HE), de acordo com o procedimento-padrão do laboratório, e foi executada reação de hibridização *in situ* para identificação do EBV, já que este é o padrão-ouro internacionalmente aceito (Gulley; Tang, 2008).

4.7 Exames de biologia molecular

Os procedimentos de extração de DNA, e o exame de PCR em tempo real foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP.

4.7.1 Extração do DNA

A extração foi efetuada com o Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit (GE HealthCare®, ref 28-9042-65).

A temperatura das amostras foi ajustada entre +18 °C/+25 °C, e em tubos de 1,5ml identificados previamente, 20µl de proteinase K foram colocados no fundo de cada tubo, junto com 200µl de amostra (sangue ou saliva), e foram acrescentados 400µl do tampão Lysis tipo 10. Seguiu-se agitação por 15 segundos.

Deixar o tubo encubar em temperatura ambiente por 10 minutos, vortexando de maneira intermitente para auxiliar na lise. Ao final dessa etapa, a cor da reação passou de vermelha para marrom escura.

Colocou-se a amostra numa coluna (parte integrante do kit), e completou-se o processo de lise pipetando o conteúdo do tubo. A tampa foi fechada e o tubo foi colocado na centrífuga, por 1 minuto a 11.000 x g. Descartou-se o sobrenadante e colocou-se o tubo de volta na coluna. A seguir adicionamos 500µl do tampão de Lysis tipo 10 à coluna. Procedemos a nova centrifugação por 1 minuto a 11.000 x g, e descartamos o sobrenadante.

Foram adicionados 500µl de tampão tipo 6, e as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 11.000 x g. O tubo coletor e o sobrenadante foram descartados. O tubo foi transferido para um novo coletor, e foram adicionados 200µl do tampão tipo 5 pré-aquecido a 70 °C. Deixou-se à temperatura ambiente por 1 minuto, e a seguir centrifugou-se por 1 minuto a 11.000 x g. A amostra extraída foi conservada à - 20°C.

4.7.2 PCR-RT

Foi usado o método SYBR Green®. O kit inclui os reagentes para detecção e amplificação.

O método de quantificação pela PCR quantitativa em tempo real é baseado no uso de uma sonda fluorescente (Taq Man) ou utilizando-se moléculas intercalantes fluorescentes (SYBR® green). O SYBR green é um corante de ácido nucléico, verde fluorescente que demonstra uma afinidade excepcional pela dupla fita de DNA. Um sistema de lentes capta a fluorescência emitida pela reação, que teve anteriormente a excitação por uma luz halógena. A fluorescência aumenta conforme o aumento das ligações dos nucleotídeos com a fita molde, em uma reação de PCR. Esta técnica consiste em monitorar em tempo real a quantidade de DNA em estudo

Na reação de 25µl, 12,5µl corresponde ao máster mix contendo a molécula fluorescente Sybr Green, 6,25µl referem-se ao mix de iniciadores e 6,25µl ao mix de amostra, ou seja, a quantidade de DNA equivalente à concentração de 2ng/µl, completando-se com o volume de água.

As condições de temperatura da PCR em tempo real foram: **1ª etapa:** 2 minutos a 50°C; **2ª etapa:** desnaturação por 10 minutos a 95°C; **3ª etapa:** 45

ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O primer designado para a amplificação do DNA do EBV é o do gene EBV- EBNA-1 Primer 1- TGA TAA CCA TGG ACG AGG AC -3'; Primer 2- GCA GCC AAT GCA ACT TGG AC.

Foi utilizado o termociclador ABI Prism 7000® SDS (Applied Biosystems, Inc.). O programa de termociclagem do PCR consistiu nas seguintes etapas: 1ª etapa: 2 minutos a 50°C, 2ª etapa: desnaturação por 10 minutos a 45°C, e 3ª etapa: 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados foram apresentados em log cópias/ml.

4.7.3 Hibridização *in situ*

Os espécimes obtidos das biópsias foram parafinados pelo serviço de patologia cirúrgica da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Os espécimes foram cortados em seções de 5 µm e montados em lâminas que foram previamente cobertas com solução a 10% de 3- aminopropiltietoxisilano (Sigma Chemical Co., MO, EUA), em etanol 100%, permanecendo em estufa a 37°C por 24 hs.

Os cortes foram desparafinizados com Xylene (30 min a 59 °C, e 20 min a 25 °C) e reidratados em etanol (absoluto 99% e 96%). Os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônia 10% com etanol 95% por 10 min para remover pigmentos do formol. Os cortes foram então lavados por 10 min em água corrente e imersos duas vezes em água destilada.

A reação para a detecção do EBV foi feita usando o PNA ISH Detection Kit (DakoCytomation®, Glostrup, Denmark). Este kit possui controles positivo e negativo, e todos os reagentes necessários para a reação. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e sofreram tratamento à base de proteína K (150 µl) diluídos em proporção 1:10 de solução-tampão à base de 10µM TRIS e NaCl, pH 7.6, por 25 min em temperatura ambiente. Os cortes foram então imersos por duas vezes em água destilada (três minutos de cada vez), e

imersos em etanol 95% por 10 segundos, e então deixados em câmara úmida por cinco minutos pra secar.

Após o tratamento com Proteinase K, colocamos duas gotas da sonda conjugada à fluoresceína (EBER- Y5200, DakoCytomation® Inc., CA, EUA) em cada corte e os cobrimos com uma lamínula , e permaneceram em estufa a 55°C por 1h e 30min. As lamínulas foram removidas e os cortes foram imersos em solução adstringente pré-aquecida, diluição 1:60 (solução adstringente 50X, DAKO, S3500), e incubados a 55°C por 25 min. Os cortes foram então brevemente imersos em solução de TBS (10mM TRIS e NaCl, ph 7.6). Os cortes foram novamente colocados em câmara úmida e duas a três gotas de anticorpo (Anti-FITC/AP) foram adicionadas em cada lamínula, e permaneceram incubados por 30min em temperatura ambiente. O anticorpo foi removido com lavagem em TBS (ph 7.5). Os cortes foram imersos duas vezes em TBS (3 min por vez) e então imersos duas vezes em água destilada (1 min cada vez).

Os cortes foram colocados em câmara úmida e duas a três gotas de substrato [BCIP (5-bromo-4-cloro-3idndolilfosfato) e NBT (tetrazolium nitroblue)] foram adicionadas. Os cortes foram incubados por 45 min em temperatura ambiente. O substrato foi removido por imersão dos cortes em água destilada. Os cortes foram então lavados em água corrente por 5 min, e foram corados com Fast-Red (Dako-Cytomation Inc., CA, EUA) por 1 min em temperatura ambiente. A seguir, foram lavados em água corrente por 5 min, e imersos em água destilada. Procedeu-se à desidratação com etanol 80% e cobriu-se a lâmina com lamínulas de vidro. A marcação positiva foi evidenciada ao microscópio óptico com coloração verde no sítio da hibridização.

4.8 Análise estatística

Os dados colhidos dos pacientes foram transferidos para uma planilha no Excel. As análises foram realizadas utilizando o pacote estatístico SPSS – Statistical Package for Social Sciences (v16.0). O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para testar a normalidade dos dados. O teste de *Mann Whitney* ou de

Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação das variáveis quantitativas. Para comparação entre frequências e proporções, foi utilizado o *Teste de Exato de Fisher*. O nível de significância foi estabelecido como 0,05 ou 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da população estudada

Foram avaliados consecutivamente 94 pacientes soropositivos para o HIV. Sessenta e oito (72,3%) eram do sexo masculino e 26 (27,7%) do sexo feminino, com média de idade de 45,2 anos.

Quanto à cor da pele, 53 pacientes foram classificados como leucodermas (56,4%), 23 melanodermas (24,5%), e 18 feodermas (19,1%).

A avaliação dos hábitos nocivos revelou que 29,8% dos pacientes eram fumantes, 24,5% declararam-se ex-fumantes e 20,2% faziam uso regular de bebida alcoólica.

Os pacientes também foram classificados de acordo com a categoria de exposição ao HIV relatada: 3 pacientes (3,2%) contraíram o HIV por meio do uso de drogas injetáveis, 42 (44,7%) através de relacionamento heterossexual, 39 (41,5%) por meio de relação sexual homossexual, 2 (2,1%) por contaminação vertical, e 8 (8,5%) pacientes não souberam informar a provável via de contaminação.

O tempo médio de infecção pelo HIV foi de 12,4 anos e 63,8% estavam em aids (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Distribuição dos pacientes quanto à classificação CDC

CATEGORIAS CLÍNICAS			
NÍVEIS DE CD4	A	B	C
>500	7	12	6
500-200	6	9	2
<200	2	8	42

A história médica revelou que 68 pacientes haviam sido acometidos por co-morbidades e 73 por doenças oportunistas sistêmicas. O gráfico 5.1 apresenta a contabilização dessas doenças.

Gráfico 5.1 – Co-morbidades e doenças oportunistas sistêmicas apresentadas pelos pacientes HIV+

Oitenta e oito pacientes (89,7%) utilizavam TARV, em média, há 9,4 anos, sendo de 3,8 anos o tempo médio de uso do esquema terapêutico atual.

A tabela 5.2 mostra a utilização e composição do esquema terapêutico atual dos 94 pacientes.

Tabela 5.2 – Utilização de antirretrovirais e composição do esquema terapêutico atual dos pacientes HIV+.

Esquema terapêutico ARV	N	%
Nenhum	6	6,4
Mono (3 ITRN)	1	1,1
Mono (1 ITRN)	2	2,1
Mono (2 ITRN)	5	5,3
Dupla (2 ITRN + 1IP)	17	18,1
Dupla (2 ITRN + 1 ITRNN)	15	16,0
Dupla (2 IP+ 1 ITRN)	5	5,3
Dupla (1 ITRN+ 1IP)	14	14,9
Dupla (1 ITRN + 1 ITRNN)	12	12,8
Dupla (3 ITRN + 2 IP)	1	1,1
Dupla (3 ITRN + 1IP)	3	3,2
Dupla (2 ITRN + 2IP)	2	2,1
Dupla (2 ITRN + 1 II)	1	1,1
Tripla (ITRN + IP + ITRNN)	5	5,3
Tripla (IF + IP + ITRN)	1	1,1
Tripla (2 ITRN + 1IP + ITRNN)	2	2,1
Tripla (1 ITRN + 2 IP + 1 II)	1	1,1
Quádrupla (1IF+ 1 ITRN+ 2 IP + 1II)	1	1,1
Total	94	100

ARV=antirretroviral; ITRN=inibidores de transcriptase reversa nucleosídeos; ITRNN=inibidores de transcriptase reversa não-nucleosídeos; IP=inibidores de protease; IF=inibidores de fusão; II=inibidores de integrase

Dos 94 pacientes, um nunca havia feito os exames de CD4 e carga viral, pois havia descoberto sua condição de soropositivo pouco tempo antes da consulta e a maioria (n=48) possuía CD4 maior ou igual a 500 céls/mm³ (Tabela 5.3). A contagem recente de linfócitos TCD4 dos pacientes variou de 25 a 1276 cels/mm³ (média de 535,9 cels/mm³) (Tabela 5.4).

A tabela 5.3 apresenta a distribuição dos níveis de CD4 dessa amostra.

Tabela 5.3 – Distribuição dos valores de contagem de linfócitos CD4 na população analisada

Categoria cd4	Número de pacientes
< 200 cels/mm³	10
200 – 499 cels/mm³	35
≥500 cels/mm³	48

O log da carga viral do HIV médio foi de 0,7, com valor mínimo de 0,0 e máximo de 5,3 (Tabela 5.4).

A carga viral do EBV no sangue e na saliva foi mensurada em cópias/10µl. Os valores numéricos foram transformados em log para tornar mais fácil a análise estatística, já que os valores de carga viral (EBV e HIV) variaram de 0 a mais de 200.000. A transformação em log não interfere no resultado do teste estatístico, uma vez que foram utilizados testes não paramétricos para analisar os dados. Os testes não paramétricos comparam a distribuição dos dados entre os grupos, e não um valor único (por exemplo, a média). Assim o teste realizado com o valor bruto ou com o valor em log fornece o mesmo resultado estatístico. A média do log da carga viral do EBV no sangue foi de 1,6 (mínimo = 0 e máximo = 4,4) e na saliva 2,4 (mínimo = 0 e máximo = 6,6) (Tabela 5.4). No apêndice A, estão disponíveis os valores brutos de das cargas virais, bem como os de CD4 dos 94 pacientes.

A tabela 5.4 evidencia os valores de média, mediana, mínimo e máximo das contagens de CD4, carga viral HIV, carga viral EBV sangue e carga viral EBV saliva e do tempo de uso de terapia antirretroviral, tempo de infecção pelo HIV e tempo de uso do esquema terapêutico atual dos pacientes.

Tabela 5.4 – Análise descritiva da população estudada (contagens de CD4, carga viral HIV, carga viral EBV sangue e carga viral EBV saliva e do tempo de uso de terapia antirretroviral, tempo de infecção pelo HIV e tempo de uso do esquema terapêutico atual)

	N	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade	94	45,2	10,1	46,0	18,0	69,0
Menor contagem CD4	93	209,1	174,8	195,0	0,0	806,0
Contagem CD4 atual	93	535,9	289,1	500,0	25,0	1276,0
Log Carga Viral HIV	93	0,7	1,6	0,0	0,0	5,3
Log Carga viral EBV - sangue	94	1,6	1,2	1,7	0,0	4,4
Log Carga Viral EBV – saliva	94	2,4	1,9	2,1	0,0	6,6
Tempo de uso da TARV	90	9,4	4,6	10,0	0,0	21,0
Tempo uso da atual TARV	90	3,8	3,4	3,0	0,0	18,0
Tempo de infecção	94	12,4	5,0	12,5	0,4	24,0

N=numero; DP= Desvio padrão; TARV= Terapia Antirretroviral

Foi também realizado o teste de Spearman's rho para avaliar a relação entre a carga viral do EBV na saliva e a carga viral do EBV no sangue, sendo encontrada uma correlação positiva entre essas duas entidades. Quanto maior a carga viral do EBV no sangue, maior a carga viral na saliva (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Correlação entre a carga viral do EBV no sangue e a carga viral do EBV na saliva dos pacientes

Log Carga Viral – EBV saliva		
Log Carga Viral – EBV sangue	Spearman's rho	0,333
	P	0,001*
	N	94

A correlação entre a carga viral do HIV e a carga viral do EBV na saliva e a carga viral do HIV em relação à carga viral do EBV no sangue foi avaliada através do teste de Spearman's rho (Tabela 5.6). Encontrou-se correlação positiva ($p=0,006$) entre a carga viral do HIV e a carga viral do EBV na saliva; quanto maior a carga viral do HIV, maior é a carga viral do EBV na saliva. No sangue essa correlação não foi observada.

Tabela 5.6 – Correlação entre a carga viral do EBV no sangue e na saliva com a carga viral do HIV

		Log Carga Viral EBV sangue	Log Carga Viral EBV saliva
Log Carga Viral – HIV	Spearman's rho	0,157	0,283
	P	0,133	0,006*
	N	93	93

Foram identificadas correlações positivas entre a carga viral do EBV no sangue e as contagens de linfócitos CD4, tanto a atual, quanto a mais baixa registrada ($p=0,030$ e $p=0,028$ respectivamente), ou seja, quanto maior a carga viral do EBV maior a contagem de CD4 (Tabela 5.7). Não houve resultado estatístico significativo em relação a carga viral do EBV no sangue ou na saliva com o tipo de terapia antirretroviral utilizada (Tabela 5.8).

Tabela 5.7 – Relação entre a carga viral do EBV no sangue e na saliva com os níveis de CD4

		Menor contagem CD4	Contagem CD4 atual
Carga viral do EBV sangue	Spearman's rho	0,228	0,225
	p	0,028*	0,030*
	N	93	93
Carga viral do EBV saliva	Spearman's rho	-0,138	-0,18
	p	0,186	0,083
	N	93	93

Tabela 5.8 – Relação entre a carga viral do EBV no sangue e na saliva com o tipo de terapia antirretroviral

Variável	Classe de tratamento	N	Média	DP	Mediana	P
Log carga viral EBV sangue	ITRN+IP+ITRNN	7	1,27	0,88	1,72	0,795
	IP+ITRNN	45	1,54	1,28	1,85	
	ITRN+ITRNN	27	1,50	1,13	1,34	
Log carga viral EBV saliva	ITRN+IP+ITRNN	7	1,40	1,12	1,60	0,446
	IP+ITRNN	45	2,51	2,10	2,18	
	ITRN+ITRNN	27	2,23	1,68	1,99	

DP: Desvio padrão ; Teste de Kruskal-Wallis

No exame clínico intra-bucal 21 pacientes foram diagnosticados com lesões. As manifestações bucais identificadas foram candidíase, leucoplasia pilosa, herpes simples labial, afta, gengivite necrosante e queilite angular (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 – Manifestações bucais apresentadas pelos pacientes HIV+

Os 28 pacientes que apresentaram suspeita clínica de LP foram submetidos a biópsia incisiva para confirmação do diagnóstico. O exame histopatológico e a hibridização *in situ* confirmaram o diagnóstico clínico em 20 pacientes (71,42% dos pacientes com diagnóstico clínico), sendo a borda lateral da língua o único sítio onde essas lesões foram encontradas. Clinicamente, essas lesões apresentaram, em alguns casos, dimensões reduzidas (Figura 5.1), sendo possível sua detecção apenas após minucioso exame clínico. Outras lesões apresentaram uma maior área afetada, como pode ser visto na figura 5.2. De qualquer forma nenhuma das lesões apresentava um aumento expressivo da queratinização do epitélio ou uma elevação importante da mucosa afetada.

Figura 5.1 – Aspecto clínico de lesão de leucoplasia pilosa, representativa das lesões clinicamente menos aparentes.

Figura 5.2 - Aspecto clínico de lesão de leucoplasia pilosa, representativa das lesões mais aparentes.

Não houve nenhuma ligação entre as características clínicas da leucoplasia pilosa com os níveis de CD4 e carga viral ou níveis do EBV no sangue e na saliva, ou seja, as lesões de maior extensão não eram necessariamente o tipo presente nos indivíduos com menor valor de linfócitos CD4 ou naqueles com elevada carga viral para o EBV.

As características histopatológicas levadas em consideração durante o exame ao microscópio óptico foram: acantose, hiperplasia epitelial, células semelhantes à coilócitos, células com núcleo fosco e halo perinuclear, ausência ou discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente. A análise histopatológica das peças revelou a presença das características descritas acima. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo denso, em alguns casos com presença de escassas células inflamatórias mononucleares, ora sem a presença dessas células inflamatórias (Figura 5.3). Em apenas um caso, houve também coinfeção por hifas de cândida.

A avaliação das reações de hibridização *in situ* foi realizada pelo pesquisador, auxiliado por um professor da disciplina de patologia bucal com larga experiência em histopatologia, para dirimir as dúvidas em relação às diferentes intensidades de marcação.

Figura 5.3 – Características histológicas da leucoplasia pilosa e reação de hibridização *in situ*. Figura A: Fragmento histopatológico, corado por H&E, exibindo epitélio pavimentoso estratificado exibindo acantose, hiperplasia epitelial, células semelhantes à coilócitos, células com núcleo fosco e halo perinuclear (aumento 100 X); Figura B: fragmento corado por H&E, exibindo células semelhantes à coilócitos (aumento 400 X). Figura C: reação de hibridização *in situ*, com marcação positiva para o EBV (aumento 100 X). Figura D: reação de hibridização *in situ* com marcação positiva para o EBV (aumento 400 X).

5.2 Análise de correlação entre a presença de LP e as outras variáveis em estudo

A primeira análise buscou identificar correlação entre presença ou não de leucoplasia pilosa em relação à idade, sexo, tempo de soropositividade para o HIV, classificação do CDC, contagem de linfócitos CD4 mais baixa registrada e contagem de linfócitos CD4 atual, carga viral para o HIV, tabagismo e tempo de uso de terapia antirretroviral.

As variáveis qualitativas (sexo, classificação do CDC e tabagismo) foram avaliadas através do teste exato de Fisher e estão escritas nas tabelas 5.9, 5.10 e 5.11.

Tabela 5.9 – Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e o sexo dos pacientes

Leucoplasia Pilosa		Sexo		Total
		Masculino	Feminino	
Sim	N	15	5	20
	%	75,0%	25,0%	100,0%
Não	N	53	21	74
	%	71,6%	28,4%	100,0%
Total	N	68	26	94
	%	72,2%	27,7%	100,0%

Teste exato de Fisher; $p=1,000$

Tabela 5.10 – Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e a classificação segundo o CDC (diagnóstico de AIDS) dos pacientes.

Leucoplasia Pilosa		Classificação CDC		Total
		Sem aids	Com aids	
Sim	N	5	15	20
	%	25,0%	75,0%	100,0%
Não	N	29	45	74
	%	39,2%	60,8%	100,0%
Total	N	34	60	94
	%	36,2%	63,8%	100,0%

Teste exato de Fisher; $p=0,301$

Tabela 5.11 – Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e o uso de tabaco pelos pacientes

Leucoplasia Pilosa		Uso de tabaco			Total
		Sim	Não	Ex-fumante	
Sim	N	6	9	5	20
	%	30,0%	45,0%	25,0%	100,0%
Não	N	22	34	18	74
	%	29,7%	45,9%	24,3%	100,0%
Total	N	28	43	23	94
	%	29,8%	45,7%	24,5%	100,0%

Teste exato de Fisher; $p=1,000$

Não foi encontrada correlação estatisticamente significante entre nenhuma das variáveis qualitativas e a presença de LP.

Entre as variáveis quantitativas foi encontrada associação estatisticamente significativa ($p=0,030$) apenas entre a idade dos pacientes e a presença de leucoplasia pilosa (tabela 5.12). A média de idade de indivíduos com leucoplasia pilosa é menor do que quem não apresenta a condição.

Tabela 5.12 – Correlação entre a presença de leucoplasia pilosa e as variáveis quantitativas dos pacientes

Variável	Leucoplasia Pilosa	N	Média	DP	Mediana	U	P
Idade	Sim	20	41,9	6,8	42,5	505	0,030*
	Não	74	46,1	10,7	47,0		
Tempo de infecção	Sim	20	11,2	5,5	11,0	613	0,239
	Não	74	12,8	4,9	13,0		
Menor contagem CD4	Sim	20	197,4	200,8	150,0	648,5	0,446
	Não	73	212,4	168,4	200,0		
Contagem CD4 atual	Sim	20	504,7	243,1	507,0	692,5	0,726
	Não	73	544,5	301,4	500,0		
Log carga viral HIV	Sim	20	1,1	1,9	0,0	625	0,155
	Não	73	0,6	1,4	0,0		
Tempo uso TARV	Sim	20	8,8	5,0	8,5	606	0,36
	Não	70	9,6	4,6	10,0		
Tempo uso da atual TARV	Sim	20	2,9	2,7	2,0	554	0,154
	Não	70	4,1	3,6	3,5		

DP: desvio padrão

A investigação da associação entre a carga viral do EBV no sangue e na saliva com a presença ou ausência de lesão de leucoplasia pilosa, identificou correlação estatisticamente significativa entre a carga viral na saliva e a presença de leucoplasia pilosa ($p=0,045$). Indivíduos com leucoplasia pilosa apresentaram maior carga viral do EBV do que os indivíduos sem essa condição (tabela 5.13).

Tabela 5.13 – Associação entre carga viral do EBV na saliva e no sangue e presença ou ausência de leucoplasia pilosa

Variável	LP	N	Media	DP	Mediana	U	P
Log carga viral EBV – sangue	Sim	20	1,34	1,22	1,51	660,5	0,457
	Não	74	1,61	1,23	1,68		
Log carga viral EBV – saliva	Sim	20	3,11	1,98	3,01	524,5	0,045*
	Não	74	2,15	1,90	1,94		

LP: Leucoplasia Pilosa; DP: desvio padrão

Resultados estatisticamente significantes também foram encontrados na associação entre histórico prévio de leucoplasia pilosa e a carga viral do EBV na saliva. Indivíduos com histórico prévio de leucoplasia pilosa apresentaram carga viral na saliva maior do que os que não relataram história prévia. Ressalta-se, porém, que dos 22 pacientes com histórico positivo para leucoplasia pilosa, 11 não apresentaram lesão no momento do exame, mas mesmo assim continuaram com carga viral maior do que aqueles que nunca apresentaram lesão (tabela 5.14).

Tabela 5.14 – Associação entre histórico de LP e carga viral do EBV na saliva

Variável	LP	N	Media	DP	Mediana	U	P
Log carga viral EBV – sangue	Sim	22	1,45	1,38	1,53	749,5	0,701
	Não	72	1,58	1,19	1,67		
Log carga viral EBV – saliva	Sim	22	3,21	2,05	3,01	544	0,026*
	Não	72	2,09	1,85	1,94		

LP: Leucoplasia Pilosa; DP: desvio padrão

6 DISCUSSÃO

A avaliação da população estudada nos permite identificar um padrão. Os pacientes avaliados eram majoritariamente, do sexo masculino, encontravam-se em média com 45 anos de idade sendo sabidamente soropositivos há cerca de 12 anos, e consequentemente, sabiam seu status sorológico aos 33 anos de idade. A categoria de exposição ao HIV predominante foi a via sexual (86%), sendo a via heterossexual a mais relatada (41,5%).

No Brasil, foram identificados, de 1980 até junho de 2008, 506.499 casos de aids, 60% deles na região sudeste. Deste total, 333.485 foram em pessoas do sexo masculino e 172.995 em mulheres. A proporção do sexo (M/F) está em 1,5:1. A faixa etária mais incidente para os homens é a de 30 a 49 anos e no sexo feminino é de 30 a 39 anos e a forma mais prevalente de exposição ao vírus foi através do contato sexual heterossexual (Boletim Epidemiológico Aids e DST Ano V nº1, 27^a à 52^a semanas epidemiológicas – julho a dezembro de 2007, 01^a à 26^a semanas epidemiológicas – janeiro a junho de 2008). Ainda que cidade de São Paulo apresente os mesmo padrões relatados pela Federação, a proporção entre homens e mulheres é levemente diferente, sendo que a quantidade de homens é mais elevada (Boletim Epidemiológico de Aids – HIV/DST e Hepatites B e C do Município de São Paulo, 2009). Os dados da população estudada mostram-se condizentes com dados epidemiológicos do Brasil e de São Paulo, tornando a amostra representativa da população HIV positiva do país.

Quanto ao estadiamento clínico da doença do HIV na população estudada, a maioria já se encontrava em aids (Tabela 5.1) tendo apresentado várias doenças oportunistas e co-morbidades. A alta incidência de doenças oportunistas sistêmicas vinculadas à imunodepressão causada pelo HIV (gráfico 5.1) reflete o estadiamento clínico da doença. Várias delas são definidoras de aids e contribuem, inequivocadamente, para o estadiamento clínico do paciente (Center for Diseases Control, 1992). Já as co-morbidades apresentadas podem estar refletindo o efeito adverso da utilização da

medicação em longo prazo, já que os pacientes utilizavam-na, em média, há mais de 9 anos.

Apesar de a HAART ter contribuído sobremaneira para o aumento da expectativa de vida e para a melhora na qualidade de vida dos pacientes com HIV/Aids, sabe-se hoje que também tem sido responsabilizada pelo aparecimento de diversos efeitos adversos nesses pacientes. Os efeitos adversos da HAART manifestam-se através da toxicidade mitocondrial, hematológica, gastrointestinal, hepática e metabólica, entre outras, e apresentam como sintomas náusea, diarreia, hiperlipiemia, dislipidemia, neuropatia, reações alérgicas, infarto do miocárdio, diabetes, mialgia, acidose láctica, hepatopatias, nefropatias, osteoporose e osteopenia (Vidal et al., 2010).

A HAART é definida como a associação de 2 ou mais classes de ARVs. Segundo o Ministério da Saúde (Brasil, 2008) a terapia inicial deve sempre incluir combinações de três drogas: dois Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN) associados a um Inibidor de Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo (ITRNN) ou a um Inibidor da Protease reforçado com ritonavir (IP/r). O esquema ARV recomendado para início de TARV atualmente é a associação entre 2 ITRN + 1 ITRNN e esquemas com IP, com o reforço farmacológico do ritonavir (IP/r), como alternativas para o início de terapia antirretroviral em pacientes virgens de tratamento (Brasil, 2008). Diversos consensos sobre TARV foram publicados desde 1997 e foram modificados em decorrência da descoberta de novas drogas ARVs e do conhecimento dos efeitos da medicação sobre os pacientes. Dez anos atrás se acreditava que a melhor escolha de associações farmacológica seria a associação entre 2 ou 3 ITRNs (Ministério da Saúde, 2000). Esse talvez seja um dos motivos da presença de diversos esquemas terapêuticos na população estudada.

Outro motivo pode residir no fato de que a maioria, dos pacientes avaliados, apesar de ter iniciado a TARV há nove anos, utilizava o mesmo esquema ARV há 3,8 anos. O ponto em comum de todas as publicações, sobre consensos de administração de TARV, feitas pelo Ministério da Saúde, era que a TARV só deveria ser modificada caso não apresentasse resultados clínicos adequados (controle da viremia e restituição imunológica). Portanto é possível

supor que esquemas anteriores tenham falhado ou não tenham atingido o objetivo de conter a replicação viral.

Ainda assim, a população estudada apresentava respostas virológica e imunológica adequadas (CD4 acima de 500 e log de CV < 1). Segundo a literatura, isso provavelmente apontaria para uma pequena quantidade de manifestações bucais oportunistas. E isso pode ser confirmado nas lesões encontradas, excetuando a LP.

Foram encontrados apenas 5 pacientes com candidíase oral e as lesões eram pouco expressivas: 1 lesão de afta, 1 lesão de herpes simples e 1 lesão de queilite angular (gráfico 5.2). Cabe salientar que a lesão aftosa e a lesão herpética apresentavam características clínicas comuns, não eram exacerbadas, nem tiveram seu curso clínico modificado quando comparado aos padrões normais. Um paciente apresentou gengivite necrosante na papila do molar superior direito. Este padrão parece refletir estudos prévios que encontraram diminuição da incidência de manifestações bucais após a HAART (Eyeson et al., 2002; Greenspan et al., 2004). De fato não puderam ser observadas manifestações que antes eram relatadas em enquetes epidemiológicas brasileiras, como o SK e o linfoma (Ortega et al., 2009).

Com relação a LP foram encontradas 20 lesões, confirmadas por hibridização in situ em biópsias colhidas. É importante verificar que, clinicamente, 28 pacientes apresentaram alterações que eram compatíveis com esse diagnóstico. Ou seja, mesmo o examinador, treinado e calibrado pode apresentar uma chance alta de equivoco (28,58%) quando o diagnóstico dessa lesão é exclusivamente clínico.

Com relação às características histológicas de lesões de LP, alguns autores relataram que, na maioria dos casos era comum identificar co-infecção por hifas de cândida (Reichart et al., 1989; Migliorati et al., 1993). Essa afirmação não pôde ser confirmada na casuística da pesquisa já que, apenas um dos casos estudados apresentou esse tipo de co-infecção.

Em pacientes infectados pelo HIV, o EBV está associado à leucoplasia pilosa, uma lesão epitelial benigna que ocorre majoritariamente na borda lateral da língua (Greenspan et al, 1998; Ambinder, 2001; Walling et al., 2003). Nesse estudo, 100% dos casos analisados foram de lesões na borda lateral da língua, sendo semelhante aos índices descritos por outros trabalhos, como o de

González et al. (2010), onde de 21 pacientes analisados, 20 (95,2%) apresentaram o sítio da lesão na borda lateral da língua. Outros trabalhos também apresentaram resultados semelhantes (Reichart et al., 1989; Greenspan et al., 1998), com a inegável preferência da lesão por esse sítio anatômico, em detrimento de outros locais, onde sua presença é escassa (Reichart et al., 1989). A prevalência da LP neste estudo também chama a atenção, pois se verifica uma prevalência de 21%. Este número não reflete a diminuição apresentada por estudos de prevalência executados após a instituição da HAART (Pinheiro et al., 2004; Hamza et al., 2006). Em contrapartida as lesões parecem mais tênues do que as identificadas antes da HAART. Talvez, com características clínicas menos exacerbadas do que as encontradas no início da epidemia, muitas lesões não estejam sendo diagnosticadas.

Os dados demográficos deste estudo revelaram ainda ser maior a prevalência da LP no sexo masculino (72,3%), sobre o sexo feminino (27,7%), e uma maior prevalência em pessoas leucodermas (56,4%), seguidos pelas pessoas melanodermas (24,5%) e feodermas (19,1%), e média etária de 45,2 anos. Esses resultados são semelhantes aos encontrados na literatura, que demonstram ser a leucoplasia pilosa uma doença que atinge indivíduos do sexo masculino em idade adulta como grupo predominante. Há ainda um grupo menor de autores que afirmam não haver relação entre o gênero e a presença de leucoplasia pilosa (Margiotta et al., 1999; Pinheiro et al., 2004).

A presença de LP, que muitas vezes foi identificada pela literatura como vinculada às taxas de CD4, carga viral do HIV, sexo, estadiamento clínico da doença do HIV, forma de exposição ao vírus e tabagismo (Shiboski et al., 1996; Patton et al., 1998; Moura et al., 2006; González et al., 2010); não se encontrou nenhuma correlação estatisticamente significativa com esses parâmetros no presente estudo.

A epidemia de HIV/Aids passou por diferentes momentos epidemiológicos, inicialmente atingindo preferencialmente homens adultos homossexuais (Brito et al., 2000). A epidemia progrediu no Brasil e no mundo e alcançou populações que antes não eram contabilizadas, ou que eram atingidas de forma inexpressiva. Assim, em 2010, após 30 anos da epidemia, existe uma aparente estabilização demográfica (Unaid, 2009). Talvez a

pressão exercida pelas características demográficas da população alvo possa ter influenciado as pesquisas prévias e assim, lesões como a LP, pareceriam mais incidentes em alguns grupos populacionais. São necessárias novas pesquisas epidemiológicas para verificar se a modificação dos padrões demográficos e geográficos da epidemia realmente pode refletir-se em alterações na incidência e prevalência de manifestações bucais.

A análise estatística também revelou ser significativa a relação entre a carga viral do EBV na saliva e no sangue ($p=0,001$), já que à medida que a carga viral no sangue aumenta, verifica-se seu aumento na saliva. Estudos foram realizados na tentativa de elucidar o significado da excreção do EBV na saliva, sendo que recentemente alguns autores defenderam a ideia de que a cavidade oral não é um reservatório para o vírus, mas um canal através do qual uma corrente de fluxo contínuo do vírus passa na saliva, apontando para a importância potencial das células epiteliais na replicação e disseminação do EBV (Hadinoto et al., 2009). Isso explicaria porque os níveis salivares e sanguíneos do EBV sofrem alterações, para mais ou para menos, de maneira equânime. Isso ocorre porque nem os níveis absolutos, nem a variação da excreção do vírus ao longo do tempo observadas na literatura podem ser explicados pelas células B só replicando o vírus no anel de Waldeyer (Laichalk; Thorley-Lawson, 2005). Calculando uma estimativa da quantidade de vírus excretada pelas células B pelo anel de Waldeyer (Laichalk et al., 2002), verificou-se uma discrepância de log 3 entre a quantidade máxima de vírus produzida pelas células B no anel de Waldeyer e os níveis medidos de EBV na saliva. Recentemente, levantou-se novamente o papel possível da infecção das células epiteliais na biologia do EBV, que tem sido detectada em culturas primárias do epitélio tonsilar (Pegtél et al., 2004); e o EBV tem sido detectado também em células epiteliais no carcinoma nasofaríngeo, onde o vírus está na forma latente (Anderson-Anvret et al., 1977), e na leucoplasia pilosa, onde o vírus está na forma lítica (Greenspan et al., 1985).

Os resultados de nosso estudo também mostraram haver uma relação entre a carga viral do HIV e a carga viral do EBV na saliva ($p=0,006$): quanto maior a carga viral do HIV, maior era a carga viral do EBV, não sendo entretanto, verificada a mesma correlação entre a carga viral do HIV e a carga viral do EBV no sangue. Aumento da excreção do EBV na saliva é relatado em um

estudo que comparou os níveis do EBV na saliva e no sangue de pacientes HIV positivos com e sem lesão de leucoplasia pilosa, que mostrou um incremento na excreção do EBV na saliva logo após a infecção pelo HIV, e naqueles indivíduos com sintomas relacionados à infecção pelo HIV (Lucht et al., 1995); nenhum marcador sorológico do EBV tem sido diretamente correlacionado com a excreção do vírus EBV, embora os títulos de anticorpos IgG para EBNA-1 fossem significativamente menores nos pacientes excretando concentrações elevadas de EBV (Lucht et al., 1995). Outro estudo, que avaliou a excreção do EBV na mononucleose infecciosa sustenta que todos os pacientes com mononucleose infecciosa tinham carga viral para o EBV significativamente maior na saliva que no sangue total ou plasma, mostrando uma persistente infectividade da saliva (Fafi-Kremer et al., 2004). Resultado semelhante também foi encontrado por Yao et al. (1985). Esses resultados sugerem que os mecanismos de replicação do EBV e a resposta imune anti-EBV específica possam ser diferentes no sangue e na cavidade oral (Nadal et al., 2002; Fafi-Kremer et al., 2004). Extrapolando essa teoria, ela poderia explicar nosso resultado estatisticamente significante, que mostrou que indivíduos com lesão de leucoplasia pilosa possuem carga viral na saliva maior do que aqueles que não possuíam a lesão.

Van Baarle et al. (2002a) mostraram que indivíduos co-infectados com o HIV e o EBV possuíam baixa contagem de células T CD27 específicas para o HIV, em contraste com o aumento de células T CD27/CD8 específicas para o EBV. Entretanto, pacientes HIV positivos com baixa contagem de células T CD27/CD8 específicas para o EBV desenvolveram Linfoma não-Hodgkin, sugerindo um papel específico dessas células no controle das infecções virais crônicas. Como a terapia antirretroviral tem aumentado a sobrevida dos pacientes, com imunossupressão média a moderada, pode crescer o risco de esses pacientes desenvolverem desordens linfoproliferativas associadas ao EBV (Vilchez et al., 2002; Vilchez et al., 2003; Ling et al., 2003).

Foi encontrada uma associação positiva e estatisticamente significante ($p=0,026$) entre a carga viral do EBV na saliva e presença de leucoplasia pilosa. Diversos estudos mostraram que o DNA do EBV na saliva é elevado em pessoas com desordens linfoproliferativas, transplantados e pessoas com aids (Sixbey et al., 1983; Thorley-Lawson, 1998; Satoh et al., 1998). Um estudo

buscou mensurar a viremia dos herpesvírus, (CMV, HSV-1 e HSV-2, HHV8 e EBV) em pacientes sob a terapia HAART, e afirma que a presença do EBV e HHV-8 em indivíduos HIV positivos é freqüente, e que essa freqüência e as cargas virais detectadas sugerem que os herpes vírus humanos tenham um risco de transmissão maior nesse tipo de paciente (Miller et al., 2006).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação à carga viral do EBV no sangue e presença de leucoplasia pilosa. Atualmente o significado da medição da carga do EBV no sangue é incerto (Kimura et al., 2008). Alguns autores sugerem que a carga do EBV pode ser um marcador útil para diagnosticar linfomas associados ao EBV, como o Linfoma não-Hodgkin (Fan et al., 2005).

A correlação positiva encontrada entre a carga viral do EBV no sangue e as contagens de linfócitos T CD4 circulantes, tanto a atual, quanto a mais baixa registrada ($p=0,030$ e $p=0,028$ respectivamente), parecem indicar o motivo pelo qual a carga viral do EBV no sangue manteve-se menor do que a da saliva nos pacientes HIV positivos. A infecção pelo EBV em células B é controlada sericamente pela produção de resposta imune específica de células T CD4 e CD8, conseqüentemente, os pacientes que apresentaram maior carga viral sérica para o EBV também apresentaram uma maior quantidade sérica de células T CD4. Isto poderia sugerir a manutenção do equilíbrio do EBV no sangue e indicaria proteção contra o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas e tumores (Landais et al., 2005; Hislop et al., 2007).

Independente da diferença entre a quantificação do EBV no sangue e na saliva foi possível identificar uma correlação positiva entre ambas as cargas virais. Ou seja, ainda que existisse uma quantidade maior de EBV na saliva essa taxa mostrava-se maior quanto maior fosse a taxa apresentada no sangue desses pacientes (Tabela 5.5). A carga viral do EBV na saliva também se mostrou maior em pacientes com história prévia da lesão ainda que muitos (11 pacientes de um total de 22) não apresentassem a LP no momento do exame.

Por outro lado foi encontrada uma correlação positiva entre a carga viral do HIV e a carga viral do EBV na saliva, mas não no sangue. Talvez isso possa ser explicado caso assumamos que a fonte primária da infecção pelo EBV sejam os linfócitos B, e os queratinócitos da mucosa oral participem sendo infectados secundariamente. No linfócito B o EBV manter-se-ia latente, em decorrência de

resposta IgG-específica contra regiões do vírus e altos níveis de células T reativas aos ciclos lítico e latente do EBV (Van Grunsven et al., 1994; Young, Rickinson, 2004), e nos queratinócitos haveria reprodução contínua em pacientes HIV positivos. Essa reprodução seria mantida em decorrência da fisiopatogenia do HIV que além de atingir linfócitos TCD4 também atinge outras populações celulares que tenham moléculas CD4 em sua superfície de membrana, como as células de Langerhans (CL) e macrófagos-monócitos. Estudos prévios mostraram que o HIV infecta, destrói e altera a função dessas células na mucosa oral (Daniels et al., 1987; Chou et al., 2000; Boy et al., 2009). Como funcionam como células apresentadoras de antígenos e estimulam a resposta T dependente (Braathen et al., 1984) a depleção das CLs facilitaria a reprodução do EBV em queratinócitos sendo responsável também pela pouca quantidade de resposta inflamatória vista nas lesões de LP. Por outro lado a pouca resposta inflamatória vista na LP também pode ser resultado da capacidade do próprio EBV em prejudicar o seu reconhecimento por células T, CD4 e CD8, através de uma forte, porém não completa, modulação HLA I e HLA II, em virtude da atividade da BNLF2a, BILF1 e BGLF5, que são expressas em diferentes pontos do ciclo celular lítico e pela interferência com a ação de células T através do homólogo viral IL-10 encontrado no gene BCRF-1 (Merlo et al., 2010).

Assim, postula-se que, após a infecção primária dos linfócitos B pelo EBV, o sistema imune manteria o equilíbrio dessa relação. Posteriormente, com a infecção pelo HIV e a baixa imunidade circulante, em decorrência da deficiência de linfócitos T CD4, o EBV aumentaria sua carga viral no sangue, mais células seriam então infectadas, e o EBV atingiria profusamente as células da mucosa oral, onde se replicaria. Altos níveis de carga viral do HIV exerceriam uma pressão extra na replicação do EBV na mucosa, auxiliados pelas próprias características do EBV. Uma vez que os pacientes já tivessem apresentado a lesão em boca, teriam níveis mais altos do EBV em saliva. A saliva serviria como fonte de re-infecção das células superficiais da mucosa e a mucosa serviria como substrato para a proliferação do vírus. Atingindo níveis mais altos de carga viral do HIV, os pacientes apresentariam maior quantidade de outras populações celulares CD4 atingidas (CL), o que diminuiria a produção de resposta imune celular contra o EBV facilitando a instalação e

reinstalação da LP. A maior carga viral encontrada na saliva também estaria implicada em uma transmissão mais eficiente do EBV a outros indivíduos. É possível pensar que com queratinócitos infectados e replicando o EBV, estes poderiam também ser fonte de infecção de linfócitos B indiretamente.

Como a doença do HIV é flutuante, ou seja, o paciente apresenta períodos com melhor ou pior respostas imunológica e virológica, essa variabilidade estaria intimamente ligada à variabilidade de expressão da carga viral do EBV, tanto em sangue quanto em saliva, relatada por trabalhos anteriores (Lechowicz et al., 2002; Stevens et al., 2002a; Ling et al., 2003). Pacientes sob HAART controlariam as taxas de replicação do HIV por mais tempo, principalmente quando iniciada precocemente, e isto poderia influenciar positivamente na expressão do EBV (Piriou et al., 2005) através da restauração da resposta T específica e, conseqüentemente, na instalação da LP.

A LP é uma lesão causada pelo EBV de características únicas. Identificada pela primeira vez em pacientes HIV positivos, posteriormente também pôde ser verificada em outros pacientes com diferentes causas de imunossupressão (Greenspan et al., 1989). Mas seu diagnóstico continua fortemente vinculado à imunodeficiência causada pelo HIV por apresentar uma prevalência indiscutivelmente maior nessa população. Assim, a investigação da patogenia da infecção pelo EBV em pacientes soropositivos para o HIV deve levar em consideração a doença de base. Avaliar a infecção pelo EBV em pacientes com LP, desconsiderando ou minimizando os efeitos da patogenia da infecção pelo HIV ou as mudanças de seu curso clínico vinculadas à HAART, parece não ser a melhor estratégia.

Nessa linha, um estudo buscou correlacionar a carga viral do EBV com a carga viral do HIV e contagem de linfócito TCD4, e relata que a carga viral do EBV aumenta nas células PBMC em pacientes com o HIV, mas que essa relação com a carga viral e as células CD4 não é simples: a carga do EBV não é normalmente detectada no soro ou plasma em pacientes imunocomprometidos sem a presença de tumores, mas é detectado em fluidos de pacientes que apresentam tumores (Lechowicz et al., 2002). Em outro trabalho, que avaliou uma coorte de 113 pacientes soropositivos para o HIV, a carga viral do EBV não se correlacionou com os estágios clínicos da infecção pelo HIV ou mesmo com a replicação do HIV e com o grau de

imunossupressão causado pelo HIV (Dehee et al, 2001). Stevens et al. (2002a), afirmam não haver associação entre a carga viral do EBV e a terapia HAART, sendo que os valores absolutos da carga viral do EBV teriam pobre valor diagnóstico em indivíduos soropositivos para o HIV, não servindo, portanto para definir o risco dessa população de desenvolverem doenças associadas ao EBV (Stevens et al., 2002). Estudo de Ling et al. (2003) mediu a carga viral do EBV em saliva e sangue de pacientes soropositivos para o HIV, e comparou os resultados com um grupo controle soronegativo; constatou que os níveis são mais altos em pacientes soropositivos; eles afirmam que futuros estudos que avaliem a dinâmica da infecção pelo EBV são necessários, pois as evidências sugerem que há um risco persistente de ocorrer algumas doenças associadas ao EBV nesses indivíduos.

Em nosso estudo não foi encontrada relação entre o tipo de medicação antirretroviral, ou regime terapêutico utilizado e a presença de leucoplasia pilosa. Esses achados estão de acordo com outros trabalhos da literatura, como os de Tappuni e Fleming. (2001) e Chattopadhyay et al. (2005), que também não encontraram nenhuma associação entre leucoplasia pilosa e medicação antirretroviral. Margiotta et al. (1999) relatam, por sua vez, uma correlação positiva entre falha da medicação antirretroviral e presença de leucoplasia pilosa. Há também outro trabalho que observou uma redução da prevalência de leucoplasia pilosa em pacientes fazendo uso desse tipo de medicação (Logan et al., 2001). Apesar de certa controvérsia na literatura, nossos resultados reforçam a opinião de que não há correlação entre terapia antirretroviral e presença de LP.

A terapia antirretroviral tem incontestavelmente reduzido a morbidade e a mortalidade das pessoas infectadas pelo HIV, aumentando a expectativa de vida e melhorando sua qualidade, mas ainda são necessários estudos que elucidem se a extensão dessa recuperação dos níveis de CD4 representa uma recuperação qualitativa da resposta imune, e não apenas quantitativa (Pallela et al., 1998; Murphy et al., 2001).

A leucoplasia pilosa apesar de ter sofrido redução de incidência, mostrou-se como a mais refratária lesão ao tratamento com antivirais, já que o número de ocorrências diminuiu ao longo dos anos, mas não de maneira gradual e constante como a candidíase e o SK (Ortega et al., 2009). Em nosso

estudo observamos que as características clínicas da lesão sofreram uma alteração do padrão histórico encontrado em nosso ambulatório: de uma lesão ampla, de aspecto florido, que ocupa grande área da borda lateral da língua, para uma lesão muito mais discreta, apesar da elevada contagem de células TCD4 (média de 504,7 céls/mm³), muito próxima da média registrada pelos pacientes sem a lesão (544,5 céls/mm³). Essa contagem elevada de linfócitos CD4 difere do encontrado na literatura, que sempre associou a lesão de leucoplasia pilosa com baixa contagem de células TCD4, e eventual falha terapêutica, sendo considerado um marcador da progressão da aids (Margiotta et al., 1999; Birnbaum et al., 2002; Teo, 2002; Chattopadhyay et al., 2005). A literatura tem investigado um possível surgimento de cepas virais resistentes com reduzida susceptibilidade as drogas antivirais (Pandit et al., 2008). A resistência viral às drogas é resultado da supressão incompleta da replicação do HIV (Shafer et al., 2000), já que mesmo fazendo uso de terapia HAART, com diferentes classes de droga, não há eliminação por completo do vírus, mesmo que o paciente apresente carga viral abaixo dos limites detectáveis de 50 cópias/ml (Palmer et al., 2003; Kieffer et al., 2004; Tobin et al., 2005; Sahu et al., 2009).

O surgimento de variantes resistentes à terapia é uma evidência da variabilidade e da dinâmica evolutiva viral, por meio da adaptação do vírus à pressão seletiva das drogas antirretrovirais. Diferentes modificações genéticas têm sido associadas a mutações que favorecem a replicação do HIV na presença de drogas antirretrovirais, representando importante limitação no controle terapêutico da infecção (Coffin, 1995; Clavel et al., 2004). É provável que as variantes mutagênicas associadas à resistência de uma droga estejam presentes quando do início da terapia, sendo que esta pressionaria a evolução viral, selecionando as variantes mais adequadas para replicação em um ambiente sob terapia antiviral (Coffin, 1995). Assim, essas lesões de leucoplasia com aspecto clínico pouco pronunciado poderiam indicar genótipos diversos do HIV, resultantes dos anos de pressão seletiva efetuado pela terapia HAART em nossa população.

Poderíamos ainda pensar na Síndrome da Reconstituição Imune Inflamatória (IRIS, de Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome, em

inglês). Dado a recente evolução das tendências terapêuticas, causadas pela terapia HAART, os efeitos desse tipo de terapia ainda são pouco compreendidos e estudados (Lima et al., 2010). A síndrome é usualmente consequência de uma exagerada ativação do sistema imune contra um antígeno persistente (IRIS paradoxal) ou patógenos viáveis (IRIS mascarada).

Complicações decorrentes da IRIS incluem o agravamento paradoxal de infecções oportunistas, ou o desmascaramento de infecções não tratadas, previamente subclínicas (Shelburne et al., 2002; French et al., 2004; Singh et al., 2007). Podemos conjecturar a possibilidade de que as lesões de leucoplasia pilosa observadas nesse estudo fossem resultado dessa infecção subclínica.

Alguns estudos reportaram um aumento no risco de desenvolvimento da IRIS em pacientes que iniciam o tratamento antirretroviral em estágio de imunodeficiência avançada (French et al., 2000; Jevtovic et al., 2005; Bourgarit et al., 2006). A proporção de pacientes que desenvolvem IRIS é muito alta naqueles com retinite por citomegalovirus, alta nos que possuem meningite criptococcica, leucoencefalopatia multifocal progressiva e tuberculose, e finalmente naqueles com sarcoma de Kaposi ou herpes zoster (Muller et al., 2010). Em nosso estudo, porém, não temos a informação da condição de imunodeficiência em que nossos pacientes iniciaram a terapia antirretroviral. Estudos sobre os efeitos da IRIS em lesões oportunistas bucais são raros na literatura, mas o grau de supressão da carga viral induzido pela terapia HAART, bem como a melhora nos valores de CD4, inclusive com a progressiva melhora da relação entre células TCD4/TCD8, descrito na literatura (Li et al., 1998; Valdez et al., 2000) poderia estar relacionado ao aparecimento das lesões de leucoplasia pilosa em pacientes com carga viral indetectável e altos valores de linfócitos CD4, como os observados nesse estudo. Não pudemos obter os valores de linfócitos CD8, nem a razão CD4/CD8 dos sujeitos de nossa pesquisa, que seriam interessantes para analisarmos se haveria relação entre melhora dessa razão e do número de linfócitos CD8 com a presença ou não da lesão de leucoplasia pilosa.

Resta ainda o papel que o próprio EBV pode desempenhar em relação às características clínicas da lesão. Sabemos que infecções causadas por genótipos diferentes de um mesmo vírus podem resultar em respostas diferentes a um tratamento específico (Alter et al., 1999; Lal et al., 2005). O papel da infecção do EBV, seus mecanismos de ação na patogênese da leucoplasia pilosa e sua interação com o hospedeiro não são totalmente conhecidos (Walling et al., 2003).

Alguns autores reconhecem a ocorrência de leucoplasia pilosa subclínica, que teria como diferencial da leucoplasia pilosa clínica apenas a ausência da hiperqueratina na camada superficial do epitélio, o que impede sua visão clínica na cavidade oral, somente sendo identificada através de exame histopatológico (Mabruk et al., 1995; Dias et al., 2000).

Estudos de genotipagem do EBV associados às lesões orais em pacientes HIV positivos ou mesmo com outros tipos de imunocomprometimento, bem como estudos de genotipagem do próprio HIV ainda são raros e não está estabelecida na literatura, a prevalência de um dos tipos de EBV na patogênese da lesão. Um estudo realizado para se verificar qual tipo do EBV era mais prevalente em lesões de leucoplasia pilosa, utilizando-se, para isso, de genotipagem, encontrou o tipo 1 do EBV como o prevalente nas lesões de LP, sugerindo que o tipo 1 possa estar, de alguma forma correlacionado com a ocorrência de LP (Robaina et al., 2008). De acordo com a literatura, estudos *in vitro* sugerem que há diferenças biológicas entre o tipo 1 e o tipo 2 do EBV. Linhagens celulares de linfócitos contendo EBV-2 mostram uma taxa de crescimento inferior e significativamente mais baixa de saturação quando comparada às linhagens de células EBV-1. Estas diferenças são atribuídas às formas divergentes do gene EBNA-2 (Borish et al., 1992; Lin et al., 1993; Palefsky et al., 2002; Peh et al., 2002; Sitki-Green et al., 2002).

Alguns trabalhos estudaram amostras de sangue periférico e raspado de borda de língua de 16 pacientes com LP. Em 10 (63% das amostras) de raspado de língua, havia apenas infecção pelo EBV-1 e nos 47% restantes, havia coinfeção. Já no sangue periférico, havia a presença de EBV 1 em 44% das amostras, coinfeção em 44% das amostras, e infecção somente pelo tipo

2 em 22% das amostras, constatando que não havia o mesmo tipo de EBV na amostra de raspado e no sangue de um mesmo paciente. A justificativa dada pelos autores é de que esta alternância se dá através da constante reinfecção e trânsito do EBV entre células epiteliais e sangue (Palefsky et al., 2002).

Estudo semelhante a esse foi realizado, porém acrescentando-se saliva às amostras coletadas, chegando a resultados semelhantes, descrevendo que em alguns casos não houve correspondência entre o genótipo encontrado no sangue, no raspado e na saliva. Os autores sugeriram que a infecção pelo EBV é um evento dinâmico e que a recontaminação favorece o aparecimento de novas cepas, e assim pode haver o aparecimento de recombinações genéticas intra-hospedeiro que passam a transitar tanto no epitélio oral quanto nos linfócitos (Stiki-Green et al., 2002).

Muitos trabalhos baseiam-se em estudos de linhagens de células linfoblastoides *in vitro*, para analisar a infecção e monitorar a transição entre os genótipos do EBV. No entanto, ainda pouco se sabe sobre sua infecção em células epiteliais e sua ação *in vivo*, principalmente em relação à LP, cuja patogênese ainda não foi completamente esclarecida.

Futuros estudos prospectivos de acompanhamento clínico desses pacientes, com exames de genotipagem para o EBV e para o HIV seriam importantes para o esclarecimento do real papel da lesão de LP no paciente infectado pelo HIV e qual a possível causa dos variados aspectos clínicos observados no decorrer do curso da infecção pelo HIV, desde o surgimento da TARV.

Seria interessante também realizar um trabalho prospectivo com esse grupo de pacientes, para acompanhar novos episódios de LP, e comparar as cargas virais do HIV e do EBV com os episódios pregressos da lesão, e verificar se há significativa alteração desses valores numa recidiva da leucoplasia pilosa.

7 CONCLUSÕES

- 1) A presença de LP reflete cargas virais significativamente mais altas na saliva e no sangue de pacientes HIV+ da população estudada, sendo que a carga viral na saliva é maior.
- 2) Não há a correlação entre presença de LP com sexo, tempo de soropositividade para o HIV, classificação do CDC, contagem de linfócitos CD4 mais baixa registrada e contagem de linfócitos CD4 atual, carga viral para o HIV, tabagismo e tempo de uso de terapia antirretroviral.
- 3) Foi encontrada correlação entre a carga viral do EBV no sangue e a taxa de CD4.
- 4) Foi encontrada correlação entre a carga viral do HIV e a carga viral do EBV na saliva.
- 5) Existe correlação estatisticamente significativa entre a carga viral do EBV na saliva e a carga viral do EBV no sangue (quanto maior a carga viral do EBV no sangue maior a carga viral na saliva).

REFERÊNCIAS¹

Alter MJ, Kruskon-Moran D, Nainan OV, Mcquillan GM, Gao F, Moyer LA, et al. The prevalence of hepatitis C virus in United States 1988 through 1994. *N Engl J Med*. 1999;341:556-62.

Ambinder RF. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferations in the AIDS setting. *Eur J Cancer* 2001;37:1209–16.

Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus–infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood*.1995;85:744–50.

Andersson-Anvret M, Forsby N, Klein G, Henle W. Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological examination. *Int J Cancer* 1977; 20:486–49

Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med*. 1999;16:567–76.

Baccaglini L, Atkinson JC, Patton LL, Glick M, Ficarra G, Peterson DE, et al. Management of oral lesions in HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(Suppl 1):S50.e1-S50.e23.

Bachrach G, Leizerovici-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett Applied Microbiol*. 2003;36:50-3.

Bai X, Hosler G, Rogers B, Dawson DB, Scheuermann RH. Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Chem*. 1997;43:1843–49.

---

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Barr CE, Lopez MR, Rua-Dobles A, Miller LK, Mathur- Wagh U, Turgeon LR. HIV-associated oral lesions: immunologic, virologic and salivary parameters. J Oral Pathol Med. 1992;21:295–98.

Begg MD, Lamster IB, Panageas KS, Mitchell-Lewis D, Phelan JA, Grbic JT. A prospective study of oral lesions and their predictive value for progression of HIV disease. Oral Dis. 1997;3:176–83.

Birnbaum W, Hodgson TA, Reichart PA, Sherson W, Nittayananta SW, Axell TE. Prognostic significance of HIV-associated oral lesions and their relation to therapy. Oral Dis 2002;8(Suppl.2): 110-14.

Boletim Epidemiológico Aids e DST Ano V nº1, julho a dezembro de 2007 – janeiro a junho de 2008. Disponível em URL: <http://www.aids.gov.br/publicacao/boletim-epidemiologico-aids-ano-v-no-1-julho-dezembro-de-2007janeiro-junho-de-2008> [2010 set 28].

Boletim Epidemiológico de Aids – HIV/DST e Hepatites B e C do Município de São Paulo, Ano XIII – Nº 12 – junho 2009. Disponível em URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa74_dstaids.htm [2010 set 28].

Bonnet F, Jouvencel AC, Parrens M, Leon MJ, Cotto E, Garrigue I, et al. A longitudinal and prospective study of Epstein–Barr virus load in AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. J Clin Virol. 2006;36:258–63.

Borisch B, Finke J, Hennig I, Delacrétaz F, Schneider J, Heitz PU, Laissue JA. Distribution and localization of Epstein-Barr virus subtypes A and B in AIDS-related lymphomas and lymphatic tissue of HIV-positive patients. J Pathol. 1992 Oct;168(2):229-36.

Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. Nat Med. 2002;8:594–9.

Boulter AW, Soltanpoor N, Swan AV, Birnbaum W, Johnson NW, Teo CG. Risk factors associated with Epstein-Barr virus replication in oral epithelial cells of HIV-infected individuals. AIDS. 1996 Aug;10(9):935-40.

Bourgarit A, Carcelain G, Martinez V, Lascout C, Delcey V, Gicquel C et al. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. AIDS. 2006;20:1–7.

Boy SC, van Heerden MB, Wolfaardt M, Cockeran R, Gema E, van Heerden WF. An investigation of the role of oral epithelial cells and Langerhans cells as possible HIV viral reservoirs. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jan;38(1):114-9.

Braathen LR, Bjercke S, Thorsby E. The antigen-presenting function of human Langerhans cells. *Immunobiology*. 1984;168(3-5):301-12.

Bravo IM, Correnti M, Escalona L, et al. Prevalence of oral lesions in HIV patients related to CD4 cell count and viral load in a Venezuelan population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;1:33–9.

Brasil. Ministério da Saúde. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV. Comitê assessor para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, Coordenação Nacional de DST/aids – Ministério da Saúde, 2000. Disponível em URL: <http://www2.aids.gov.br/data/documents/storedDocuments> [2010 set 28].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV 7ª Ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. 2008:Brasília.

Braz-Silva P, Ortega KL, Rezende NP, Daumas F, Magalhães MHCG. Detection of Epstein-Barr Virus (EBV) in the Oral Mucosa of Renal Transplant Patients. *Diagn Citophatol*. 2006 Jan;34(1):24-8.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;34:207-17.

Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS. Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol*. 1992;66:2689–97.

Buck M, Cross S, Krauer K, Kienzle N, Sculley TB.. A-type and Btype Epstein Barr virus differ in their ability to spontaneously enter the lytic cycle. *J Gen Virol*. 1999;80:441–5.

Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, Saag MS, Squires K, Sillers M, et al. Initial increase in blood CD4 lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest*. 1999;103:1391–8.

Ceballos-Salobreña A, Aguirre-Urizar JM, Bagan-Sebastian JV. Oral manifestations associated with human immunodeficiency virus infection in a Spanish population. *J Oral Patho Med*. 1996 Nov;25(10):523-6.

Center for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1992;41(RR-17):1-19.

Chattopadhyay A, Caplan DJ, Slade GD, Shugars DC, Tien H, Patton LL. Incidence of oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults in North Carolina. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99:39-47.

Chattopadhyay A, Caplan DJ, Slade GD, Shugars DC, Tien HC, Patton LL. Risk indicators for oral candidosis and oral hairy leukoplakia in HIV infected adults. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33:35-44.

Cho YG, Gordadze AV, Ling PD, Wang F. Evolution of two types of rhesus lymphocryptovirus similar to type 1 and type 2 Epstein-Barr virus. *J Virol*. 1999;73:9206-12.

Chou LL, Epstein J, Cassol SA, West DM, He W, Firth JD. Oral mucosal Langerhans' cells as target, effector and vector in HIV infection. *J Oral Pathol Med*. 2000 Sep;29(8):394-402.

Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med*. 2004; 350:1023-35.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: Implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science*. 1995;267:483-89.

Cohen JL. Epstein-Barr Virus infection. *New Eng J Med*. 2000;343(7):481-92.

Cohen J. Brazil: ten years after. *Science*. 2006;313:484-7.

Coogan MM, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ*. 2005;83:700-6.

Correa RM, Fellner MD, Durand K, Redini L, Alonio V, Yampolsky C, et al. Epstein Barr Virus Genotypes and LMP-1 Variants in HIV-Infected Patients . J Med Virol. 2007;79:401–7.

Corso B, Eversole LR, Hutt-Fletcher L. Hairy leukoplakia: Epstein-Barr virus receptors on oral keratinocyte plasma membranes. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1989;67:416–21.

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

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

Darout IA, Albandar JM, SkaugN, Ali RW. Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. J Clin Periodontol 2002; 29:411–20.

Dehee A, Asselot C, Piolot T, Jacomet C, Rozenbaum W, Vidaud M, Garbarg-Chenon A, Nicolas GC. Quantification of Epstein-Barr Virus Load in Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Using Real-Time PCR. J Med Virol. 2001;65:543-52.

Dias EP, Rocha ML, Silva Júnior A, Spyrides KS, Ferreira SM, Polignano GA, et al. Oral hairy leukoplakia. Histopathologic and cytopathologic features of a subclinical phase. Am J Clin Pathol. 2000 Sep;114(3):395-401.

Diaz-Mitoma F, Ruiz A, Flowerdew G, Houston S, Romanowski B, Kovithavongs T et al. High levels of Epstein-Barr virus in the oropharynx: a predictor of disease progression in human immunodeficiency virus infection. J Med Virol. 1990;31:69–75.

Ec-Clearinhouse on Oral Problems and Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency virus. Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. J Oral Pathol Med. 1993;22(7):289-91.

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

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC, N. Wengenack L, Rosenblatt JE, Cockerill III FR, Smith TF. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:165–256.

Eversole LR, Jacobsen P, Stone CE, Freckleton V. Oral condyloma planus (hairy leukoplakia) among homosexual men: a clinicopathologic study of thirty-six cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986;61(3):249-55.

Eyeson JD, Tenant-Flowers M, Cooper DJ, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Oral manifestations of an HIV positive cohort in the era of highly active antiretroviral therapy (HAART) in South London. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31(3):169-74.

Fachiroh J, Schouten T, Hariwiyanto B, Paramita DK, Harijadi A, Haryana SM, et al. Molecular diversity of Epstein-Barr virus IgG and IgA antibody responses in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of Indonesian, Chinese, and European subjects. *J Infect Dis.* 2004 Jul 1;190(1):53-62.

Fafi-Kremer S, Brengel-Pesce K, Bargues G, Bourgeat J, Genoulaz O, Seigneurin M, et al. Assessment of automated DNA extraction coupled with real-time PCR for measuring Epstein-Barr virus load in whole blood, peripheral mononuclear cells and plasma. *J Clin Virol.* 2004;30:157–64.

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 Inf Dis.* 2005;191:985-89.

Falk KI, Zou JZ, Lucht E, Linde A, Ernberg I. Direct identification by PCR of EBV types and variants in clinical samples. *J Med Virol.* 1997;51:355–63.

Fan H, Kim SC, Chima CO, Israel BF, Lawless KM, Eagan PA, et al. Epstein-Barr viral load as a marker of lymphoma in AIDS patients. *J Med Virol* 2005; 75: 59-69.

Faulkner GC, Burrowa SR, Channa R, Moss DJ, Bird AG, Crawford DH. B lymphocytes are the target cell for primary infection with Epstein-Barr virus. *J Virol.* 1999;73:1555-1564.

French MA, Price P, Stone SF. Immune restoration disease after antiretroviral therapy. *AIDS.* 2004;18: 615-27.

French MA, Lenzo N, John M, Mallal SA, McKinnon EJ, James IR, et al. Immune restoration disease after the treatment of immunodeficient HIV-infected patients with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2000;1:107-15.

Gan YJ, Chodosh J, Morgan A, Sixbey JW. Epithelial cell polarization is a determinant in the infectious outcome of immunoglobulin A-mediated entry by Epstein-Barr virus. *J Virol.* 1997;71:519-26.

Glick M, Muzyka BC, Lurie D, Salkin LM. Oral manifestations associated with HIV-related disease as markers for immune suppression and AIDS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;77:344-49.

Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, Sidransky D, Califano JA. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope.* 2004 Jun;114(6):1027-31.

González X, Correnti M, Rivera H, Perrone M. Epstein Barr Virus detection and latent membrane protein 1 in oral hairy leukoplakia in HIV + Venezuelan patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Mar 1;15(2):e297-302.

Gratama JW, Oosterveer MA, Zwaan FE, Lepoutre J, Klein G, Ernberg I. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:8693-96.

Green TL, Greenspan JS, Greenspan D, De Souza YG. Oral lesions mimicking hairy leukoplakia: a diagnostic dilemma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67:422-26.

Greenspan JS, Greenspan DS. The epidemiology of the oral lesions of the HIV infection in the developed world. *Oral Dis.* 2002;8(Suppl2):34-9.

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

Greenspan D, De Souza, YG, Conant MA, Hollander H, Chapman SK, Lennete ET. Efficacy of desciclovir in treatment of Epstein-Barr virus infection in oral hairy leukoplakia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1990;3(6):571-8.

Greenspan JS, De Souza YG, Regezi JA, Daniels TE, Greenspan D, MacPhail LA, et al. Comparison of cytopathic changes in oral hairy leukoplakia with in situ hybridization for EBV DNA. *Oral Dis.* 1998;4:95-8.

Greenspan D, Gange SJ, Phelan JA, Navazesh M, Alves MEAF, MacPhail LA, et al. Incidence of Oral Lesions in HIV-1-infected Women: Reduction with HAART. *J Dent Res.* 2004;83;145.

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, Hearst NG, Pan LZ, Conant MA, Abrams DI, et al. Relation of oral hairy leukoplakia to infection with the human immunodeficiency virus and the risk of developing AIDS. *J Infect Dis.* 1987 Mar;155(3):475-81.

Greenspan JS, Greenspan D, Lennete 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.

Gulley, ML. Molecular diagnoses of Epstein-Barr virus related diseases. *JMD* 2001;3(1):1-10.

Gulley ML, Tang W. Laboratory Assays for Epstein – Barr Virus related disease. *The JMD* 2008;10(4):279-92.

Gulley ML, Fan H, Elmore SH. Validation of Roche LightCycler Epstein-Barr Virus Quantification Reagents in a Clinical Laboratory Setting. *JMD* 2006;8(5): 589-97.

Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathogens* 2009;5(7):e1000496.

Hamza JMO, Matee M, Simon ENM, Kikwilu E, Moshi MJ, Mugusi F, et al. Oral manifestations of HIV infection in children and adults receiving highly active anti-retroviral therapy [HAART] in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Oral Health.* 2006;6:12.

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

Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:587-617.

Ho DD. Time to hit HIV, early and hard. *N Engl J Med* 1995; 333: 450-1.

Hochman N, Zakay-Rones Z, Shohat H, Ever-Hadani P, Ehrlich J, Schlesinger M, et al. Antibodies to cytomegalo and Epstein-Barr viruses in human saliva and gingival fluid. *New Microbiol.* 1998 21:131-9.

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

Ikuta K, Satoh Y, 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.

Imai S, Nishikawa J, Takada K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol.* 1998;72:4371-78.

Imbronito AV, Grande SR, Freitas NM, Okuda O, Lotufo RFM, Nunes FD. Detection of Epstein-Barr vírus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *J Oral Science* 2008; 50(10): 25-31.

Itin P, Ruffi T, Rudinger R, Cathomas G, Huser B, Podvinec M et al. Oral hairy leukoplakia and HIV-negative renal transplant: a marker for immunossupresion? *Dermatol.* 1988;177:126-8.

Jevtović DJ, Salemović D, Ranin J, Pesić I, Zerjav S, Djurković-Djaković O. The prevalence and risk of immune restoration disease in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *HIV Med.* 2005;6:140-3.

Joseph AM, Babcock GJ, Thorley-Lawson DA. EBV persistence involves strict selection of latently infected B cells. *J Immunol.* 2000; 165:2975-81.

Karajannis MA, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stein H. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood*. 1997;89:2856-62.

Kieff E, Rickinson AB. In: *Fields Virology*. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin RA, editors. Philadelphia: Lippincott - Williams & Wilkins; 2007. 2603–54.

Kieffer TL, Finucane MM, Nettles RE, Quinn TC, Broman KW, Ray SC, et al. Genotypic analysis of HIV-1 drug resistance at the limit of detection: Virus production without evolution in treated adults with undetectable HIV loads. *J Infect Dis*. 2004;189:1452–65.

Kimura H, Ito Y, Suzuki RN, Ishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus load: the significance and application of each EBV-associated disease. *Rev Med Virol*. 2008;18:305-19.

King GN, Healy CM, Glover MT, Kwan JTC, Williams DM, Leigh IM, et al. Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78:718-26.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins SL, Cotran RS. *Pathologic basis of disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders 2004; 1525p.

Lacoste S, Wiehenc E, Santos Silva AG, Guffei A, Williams G, Lowbeer M, et al. Chromosomal rearrangements after ex vivo Epstein-Barr virus (EBV) infection of human B cells. *Oncogene*. 2010;29:503–15.

Lai KK, Cook L, Krantz EM, Corey L, Icmome KL. Calibration curves for real time PCR. *Clin Chem*. 2005;57(7):1132-6.

Laichalk LL, Hochberg D, Babcock GJ, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity*. 2002;16:745–54.

Laichalk LL, Thorley-Lawson DA. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*. 2005;79:1296–307.

Lal RB, Chakrabarti S, Young C. Impact of genetic diversity of HIV-1 in diagnosis, antiretroviral therapy and vaccine development. *Indian J Med Res.* 2005;121(4):287-314.

Landais E, Saulquin X, Houssaint E. The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol.* 2005;49(2-3):285-92.

Laroche C, Drouet EB, Brousset P, Pain C, Boibieux A, Biron F, et al. Measurement by the polymerase chain reaction of the Epstein-Barr virus load in infectious mononucleosis and AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. *J Med Virol* 1995;46:66-74.

Laskaris G, Hadjivassiliou M, Stratigos J. Oral signs and symptoms in 160 Greek HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med.* 1992;21:120-23.

Lechowicz MJ, Lin L, Ambinder R. Epstein-Barr virus DNA in body fluids. *Curr Opin Oncol.* 2002;14:533-7.

Lederman MM. Immune restoration and CD4+ T-cell function with antiretroviral therapies. *AIDS* .2001;15(Suppl.2):S11-5.

Legoff J, Amiel C, Calisonni O, Fromentin D, Rajoely B, Abuaf N, et al. Early impairment of CD8+ T cells immune response against Epstein-Barr virus (EBV) antigens associated with high level of circulating mononuclear EBV DNA load in HIV infection. *J Clin Immunol.* 2004 Mar;24(2):125-34.

Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait Mohand H, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet.* 1998;351:1682-6.

Lima VD, Harrigan PR, Sénécal M, Yip B, Druyts E, Hogg RS, Montaner JSG. Epidemiology of antiretroviral multiclass resistance. *Am J Epidemiol.* 2010;72(4):460-8.

Limaye AP, Huang M, Atienza EE, Ferrenberg JM, Corey L. Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1113-6.

Lin JC, Wan WY, Chen KY, Wei YH, Liang WM, Jan JS, et al. Quantification of Plasma Epstein-Barr Virus DNA in Patients with Advanced Nasopharyngeal Carcinoma. *New Engl J Med.* 2004;350:2461-70.

Lin JC, Lin SC, De BK, Chan WP, Evatt BL, Chan WC. Precision of genotyping of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction using three gene loci (EBNA-2, EBNA-3C, and EBER): predominance of type A virus associated with Hodgkin's disease. *Blood*. 1993 Jun 15;81(12):3372-8.

Ling PD, Vilchez RA, Keitel WA, Poston DG, Peng RS, White ZS, et al. Epstein-Barr Virus DNA Loads in Adult Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected Patients Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*. 2003;37:1244-49.

Lo YM, Chan LYS, Chan ATC, Leung S, Lo K, Zhang J, Lee JKC, Hjelm NM, Johnson JP, Huang DP. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1999;59:5452–5.

Logan RM, Coates EA, Pierce AM, Wilson DF. A retrospective analysis of oral hairy leukoplakia in South Australia. *Aust Dent J*. 2001;46:108–13.

Lopez V, Young LS, Murray PG. Epstein-Barr Virus associated cancers: aetiology and treatment. *Herpes*. 2003,10(3):78-82.

Loughrey M, Trivett M, Lade S, Murray W, Turner H, Paul Waring P. Diagnostic application of Epstein–Barr virus-encoded RNA in situ hybridization. *Pathology*. 2004;36(4):301–8.

Lourenço AG, Figueiredo LT. Oral lesions in HIV infected individuals from Ribeirão Preto, Brazil. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:281-86.

Lozada-Nur F, Costa C. Retrospective findings of the clinical benefits of podophyllum resin 25% sol on hairy leukoplakia. Clinical results in nine patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73:555–8.

Lucas KGR, Burton RL, Zimmerman SE, Wang J, Cornetta KG, Robertson KA, et al. Semiquantitative Epstein- Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood*. 1998;91:3654–61.

Lucht E, Biberfeld P, Linde A. Epstein-Barr vírus (EBV) DNA in saliva and EBV serology of HIV-infected persons with and without hairy leukoplakia. *J of Infect*. 1995;31:189-94.

- Mabruk MJE, Flint SR, Toner M, Leonard N, Shells O, Coleman DC, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in tongue tissues from AIDS autopsies without clinical evidence of oral hairy leukoplakia. *J Oral Pathol Oral Med*. 1995; 24(3):109-12.
- Mabruk MJ, Flint SR, Toner M, Balluz I, Coleman D, Sullivan D, Atkins GJ. In situ hybridization and the polymerase chain reaction (PCR) in the analysis of biopsies and exfoliative cytology specimens for definitive diagnosis of oral hairy leukoplakia (OHL). *J. Oral Patho Med* 1996;25:170-6.
- Mannelli F, Galli L, Ficarra G, Romagnoli P, Vierucci S, de Santino M. Oral hairy leukoplakia in two children with perinatally acquired HIV-1 infection. *Pediatr AIDS HIV Infect*. 1995;6(1):21-3.
- Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Abadessa V. HIV infection: oral lesions, CD4+T cell count and viral load in a Italian study population. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(40):173-7.
- Mattos J, Saarela M, Alaluusua S, Oja V, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *J Clin Microbiol*. 1998;36:157–60.
- Merlo A, Turrini R, Dolcetti R, Martorelli D, Muraro E, Comoli P, et al. The interplay between EBV and the immune system: a rationale for adoptive cell therapy of EBV-related disorders. *Haematologica*. 2010 Apr 26. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20421267.
- Middeldorp JM, Pegtel DM. Multiple roles of LMP1 in Epstein-Barr virus induced immune escape. *Semin Cancer Biolo*. 2008;18:388–96.
- Migliorati CA, Jones AC, Baughman PA. Use of cytology in the diagnosis of hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993;76(6):704-10.
- Miller CS, Berger JR, Mootoor W, Avdiushko SA, Zhu H, Kryscio RJ. High Prevalence of Multiple Human Herpesviruses in Saliva from Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Clin mMicrobiol*. 2006;44(7):2409–15.
- Moniaci D, Greco D, Flecchia G, Raiteri R, Sinicco A. Epidemiology, clinical features and prognostic value of HIV-1 related oral lesions. *J Oral Pathol Med*. 1990 Nov;19(10):477-81.

Moura MDG, Grossmann SMC, Fonseca LMS, Senna MIB, Mesquita RA. Risk factors for oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults of Brazil. *J Oral Pathol Med.* 2006;35:321–6.

Müller M, Wandel S, Colebunders R, Attia S, Furrer H, Egger M. Immune reconstitution inflammatory syndrome in patients starting antiretroviral therapy for HIV infection: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:251–61.

Murphy EL, Collier AC, Kalish LA, Assmann SF, Para MF, Flanigan TP, et al. Highly active antiretroviral therapy decreases mortality and morbidity in patients with advanced HIV disease. *Ann Intern Med.* 2001;135:17–26.

Nadal D, Blasius M, Niggli FK, Meier G, Berger C. Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in palatine tonsils and autologous. *J Med Virol.* 2002 67:54–8.

Niedobitek G, Agathangelou A, Steven N, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis: detection of the virus in tonsillar B lymphocytes but not in desquamated oropharyngeal epithelial cells. *Mol Pathol.* 2000;53:37–42.

Niedobitek G, Young LS. Epstein-Barr virus persistence and virus-associated tumours. *Lancet.* 1994;343:333–5.

Niedobitek G, Young LS, Lau R, Brooks L, Greenspan D, Greenspan JS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus infection in oral hairy leukoplakia: virus replication in the absence of a detectable latent phase. *J Gen Virol.* 1991;72:3035–46.

Nittayananta W, Chungpanich S. Oral lesions in a group of Thai people with AIDS. *Oral Dis* 1997 May;3 (Suppl 1):S41–5.

Ortega KL, Ceballos-Salobreña A, Gaitán-Cepeda LA, Magalhães MG. Oral manifestations after immune reconstitution in HIV patients on HAART. *Int J STD AIDS.* 2008 May;19(5):305–8.

Ortega KL, Vale DA, Magalhães MHCG. Impact of PI and NNRTI HAART-based therapy on oral lesions of Brazilian HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med.* 2009 Jul;38(6):489–94.

O'Sullivan CE, Peng RS, Cole KS, Montelaro RC, Sturgeon T, Jenson HB, et al. Epstein-Barr Virus and human immunodeficiency virus serological responses and viral burdens in HIV-infected patients treated with HAART. *L Med Virol*. 2002;67:320-6.

Palefsky JM, Berline J, Greenspan D, Greenspan J. Evidence for trafficking of Epstein-Barr virus strains between hairy leukoplakia and peripheral blood lymphocytes. *J Virol*. 2002;83:317-21.

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998 Mar 26;338(13):853-60.

Palmer S, Wiegand AP, Maldarelli F, Bazmi H, Mican JM, Polis M, et al. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:4531-6.

Pandit A, Mackay WG, Steel C, van Loon AM, Schuurman R. HIV-1 drug resistance genotyping quality assessment: Results of the ENVA7 Genotyping Proficiency Programme. *J Clin Virol* 2008; 43:401-6.

Patton LL, McKaig RG, Strauss RP, JJ Eron Jr. Oral manifestations of HIV in a southeast USA population. *Oral Dis*. 1998; 4:164-9.

Patton LL, McKaig R, Strauss R, Rogers D, Eron JJ Jr. Changing prevalence of oral manifestation of human immunodeficiency virus in the era of protease inhibitor therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;89: 299-4.

Patton LL, Phelan JA, Ramos-Gomez FJ, Nittayananta W, Shiboski CH, Mbuguye TL. Prevalence and classification of HIV-associated oral lesions. *Oral Dis*. 2002;8:98-109.

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

Peh SC, Kim LH, Poppema S. Frequent presence of subtype A of Epstein-Barr virus in associated malignancies. *Pathology*. 2002;34(5):446-50.

Pinheiro A, Marcenés W, Zakrzewska JM, Robinson PG. Dental and oral lesions in HIV infected patients: a study in Brazil. *Int Dent J*. 2004;54:131-7.

Piriou ER, Von Dort K, Nanlohy NM, Miedema F, Van Oers MH, Van Baarle D. Altered EBV viral load setpoint after HIV seroconversion is in accordance with lack of predictive value of EBV load for the occurrence of AIDS-related non-Hodgkin Lymphoma. *J Immunol*. 2004;172:6931-7.

Piriou E, Jansen CA, van Dort K, De Cuyper I, Nanlohy NM, Lange JM, et al. Reconstitution of EBV latent but not lytic antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells after HIV treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Immunol*. 2005 Aug 1;175(3):2010-7.

Pulvirenti JJ. Inpatient care of the HIV infected patient in the highly active antiretroviral therapy (HAART) era. *Curr HIV Res*. 2005;3:133-45.

Ramirez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Ponce De Leon S. Prognostic value of oral candidiasis and hairy leukoplakia in 111 Mexican HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med*. 1996;25:206-11.

Ranganathan K, Reddy BV, Kumarasamy N, Solomon S, Viswanathan R, Johnson NW. Oral lesions and conditions associated with human deficiency virus infection in 300 south Indian patients. *Oral Dis*. 2000 May;6(3):152-57.

Reichart P. US1 HIV - changing patterns in HAART era, patients' quality of life and occupational risks. *Oral Dis*. 2006;12 (Suppl 1):3.

Reichart PA, Langford A, Gelderblom HR, Pohle HD, Becker J, Wolf H. Oral hairy leukoplakia: observations in 95 cases and review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 1989 Aug;18(7):410-5.

Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. *Medicina*. 2003; 36:16-23.

Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr Virus. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA editors. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 2655-700.

Rickinson AB, Young LS, Rowe M. Influence of the Epstein–Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol.* 1987;61:1310–17.

Riddler SA, Breinig MC, McKnight JLC. Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood.* 1994; 84:972–84.

Righetti E, Ballon G, Ometto L, Cattelan AM, Menin C, Zanchetta M, *et al.* Dynamics of Epstein-Barr virus in HIV-infected subjects on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2002; 16:63-73.

Robaina TF, Valladares CP, Tavares DS, Napolitano WC, LE Silva, Dias EP, *et al.* Polymerase chain reaction genotyping of Epstein-Barr virus in scraping samples of the tongue lateral border in HIV-1 seropositive patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 2008; 103(4): 326-331.

Rowe DT, Qu L, Reyes J, Jabbour N, Yunis E, Putnam P, Todo S, Green M. Use of quantitative competitive PCR to measure Epstein- Barr virus genome load in the peripheral blood of pediatric transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol.* 1997;35:1612–5.

Ruiz G, Peña P, Ory F, Echevarría JE. Comparison of commercial real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr Virus DNA. *J Clin Microbiol.* May 2005;43(5):2053–7.

Sahu GK, Paar D, Frost SDW, Smith MM. Low-level plasma HIVs in patients on prolonged suppressive highly active antiretroviral therapy are produced mostly by cells other than CD4 T-cells. *J Med Virol.* 2009;81:9-15.

Salimi B, Alonso EM, Cohn RA, Mendley SR, Katz BZ. Comparison of immortalization assay and polymerase chain reaction detection of Epstein-Barr virus in pediatric transplant recipients and control samples. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2002;2:433-43.

Sample J, Hummel M, Braun D, Birkenbach M, E K. Epstein- Barr Types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B and EBNA- 3C genes. *J Virol.* 1990; 64:4084–92.

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. *Histopathology*. 1992;20:387–95.

Satoh Y, Takasaka N, Hoshikawa Y, Osaki M, Ohfuji S, Ito H, et al. Pretreatment with restriction enzyme or bovine serum albumin for effective PCR amplification of Epstein-Barr virus DNA extracted from paraffin-embedded gastric tissue. *J Clin Microbiol*. 1998;36:3423-5.

Savoie A, Perpete C, Carpentier L, Joncas J, Alfieri C. Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant recipients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood*. 1994;83:2715–22.

Schiodt M, Pindborg JJ. AIDS and the oral cavity. Epidemiology and clinical oral manifestations of human immune deficiency virus infection: a review. *Int J Oral Maxillo Surg*. 1987a;16:1–14.

Schiodt M, Greenspan D, Daniels TE, Greenspan JS. Clinical and histologic spectrum of oral hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987b, 64:716-20.

Sculley T, Krauer K, Kienzle N. Comparison of A-type and B-type Epstein Barr virus. *Epstein Barr Virus Rep*. 1999;6:1–6.

Shaffer RW, Kantor R, Gonzales MJ. The Genetic Basis of HIV-1 resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. *Aids Rev*. 2000; 2:211-28.

Shannon-Lowe C, Adland E, Bell AI, Delecluse HJ, Rickinson AB, Rowe M. Features Distinguishing Epstein-Barr Virus Infections of Epithelial Cells and B Cells: Viral Genome Expression, Genome Maintenance, and Genome Amplification. *J Virol*. 2009;83(15):7749-60.

Shelburne ISA, Hamill RJ, Rodriguez-Barradas MC, greenberg SB, Atmar RL, Musher DW, et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome: emergence of a unique syndrome during highly active antiretroviral therapy. *Medicine*. 2002; 81:213-27.

Shiboski CH. Epidemiology of HIV-related oral manifestations in women: a review. *Oral Dis*. 1997 May;3(Suppl 1):S18-27.

Shiboski CH, Hilton JF, Neuhaus JM, Canchola A, Greenspan D. Human immunodeficiency virus-related oral manifestations and gender: a longitudinal analysis. *Arch Intern Med*. 1996;156:2249–54.

Singh N, Perfect JR. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:395–401.

Sitki-Green D, Covington M, Rab-Traub N. Compartmentalization and transmission of multiple Epstein-Barr virus strains in asymptomatic carriers. *J Virol*. 2003;77:1840–7.

Sitki-Green D, Edwards RH, Webster-Cyriaque J, Raab-Traun N. Identification of Epstein-Barr Virus strain variants in hairy leukoplakia and peripheral blood by use of a heteroduplex tracking assay. *J Virol*. 2002;76(19):9645–56.

Sixbey JW. Epstein-Barr virus and epithelial cells. *Adv Viral Oncol*. 1989;8:187–202.

Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*. 1984;310:1225–30.

Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, Raab-Traub N, Walton LA, Pagano JS. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature*. 1983;306:480–3.

Sixbey JW, Yao QY. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science*. 1992;255:1578–80.

Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. Epstein-Barr Virus in oral diseases. *J Periodont Res*. 2006;41:235–44.

Smith PR, Griffin BE. Transcription of the Epstein-Barr virus gene EBNA-1 from different promoters in nasopharyngeal carcinoma and B-lymphoblastoid cells. *J. Virol*. 1992;66:706–14.

Sternas LT, Middleton, Sugden B. The average number of molecules of Epstein-Barr nuclear antigen 1 per cell does not correlate with the average number of Epstein-Barr virus (EBV) DNA molecules per cell among different clones of EBV-immortalized cells. *J Virol*. 1990;64:2407–10.

Stevens SJC, Blank BSN, Smits PHM, Meenhorst PL, Middeldorp JM. High Epstein-Barr virus (EBV) DNA loads in HIV-infected patients: correlation with antiretroviral therapy quantitative EBV serology. *AIDS* 2002a;16:993-1001.

Stevens, SJC, Pronk I, Middeldorp JM. Toward standardization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated wholeblood as preferred clinical specimen. *J. Clin. Microbiol* 2001a; 39:1211-6.

Stevens, SJC, Verkuijlen SAWM, Van den Brule AJC, Middeldorp JM. Comparison of Quantitative Competitive PCR with LightCycler-Based PCR for Measuring Epstein-Barr Virus DNA Load in Clinical Specimens. *J Clin Microbiol*; 2002b; 40(11):3986-92.

Stevens SJC, Verschuuren EAM, Pronk I, Van der Bij W, Harmsen M, The TH, et al. Frequent monitoring of EBV DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of PTLD in high risk patients. *Blood*. 2001b;97:1165-71.

Stevens SJC, Vervoort MBHJ, Van den Brule AJC, Meenhorst PL, Meijer CJLM, Middeldorp JM. Monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood by quantitative competitive polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1999;37:2852-7.

Sulochana SB, MacKelfresh J, Fried BSL, Arbiser JL. Targeted therapy of oral hairy leukoplakia with gentian violet. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:711-2.

Tappuni AR, Fleming GJP. The effect of antiretroviral therapy on the prevalence of oral manifestations in HIVinfected patients: a UK study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92:623-8.

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

Thomas JA, Felix DH, Wray D, Southam JC, Cubie HA, Crawford DH. Epstein-Barr virus gene expression and epithelial cell differentiation in oral hairy leukoplakia. *Am J Pathol* 1991; 139:1369-80.

Thorley-Lawson DA. Ebv persistence in vivo. In: *Herpesvirus and Immunity*, Medveczky P, et al, editors. Plenum Press, Nova York: 1998: 208-29.

Thorley-Lawson DA. EBV: schizophrenic but not dysfunctional. *EBV Rep.* 1999;6:158-63.

Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr Virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2001;1:75-82.

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

Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, Pawluk DM, Mohan KM, Lewis PF, Mullins JI, Frenkel LM. Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: Expression of archival virus and replication of virus. *J Virol.* 2005;79:9625–34.

Triantos D, Porter SR, Scully C. Oral hairy Leukoplakia: clinicopathologic features, pathogenesis, diagnosis, and clinical significance. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1392-6.

UNAIDS – AIDS Epidemic Update: November 2009. [Internet] [2010 Sept 28] Available from URL: [http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700 Epi Update 2009 en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf).

Valdez H, Smith KY, Landay A, Connick E, Kuritzkes DR, Kessler H, Fox L, Spritzler J, Roe J, Lederman MB, Lederman HM, Evans TG, Heath-Chiozzi M, Lederman MM. Response to immunization with recall and neoantigens after prolonged administration of an HIV-1 protease inhibitor-containing regimen. ACTG 375 team. AIDS Clinical Trials Group. *AIDS.* 2000;14:11–21.

Van Baarle D, Hovenkamp E, Callan MF, Wolthers KC, Kostense S, Tan LC, et al. Dysfunctional Epstein–Barr virus (EBV)- specific CD8(R) T lymphocytes and increased EBV load in HIV-1 infected individuals progressing to AIDS-related non- Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2001;98:146–55.

Van Baarle D, Kostense S, Hovenkamp E, et al. Lack of Epstein-Barr virus– and HIV-specific CD27– CD8+ T cells is associated with progression to viral disease in HIV-infection. *AIDS.* 2002a;16:2001–11.

Van Baarle D, Wolthers KC, Hovenkamp E, et al. Absolute level of Epstein-Barr virus DNA in human immunodeficiency virus type 1 infection is not predictive of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma. *J Infect Dis.* 2002b;186:405–9.

Van Grunsven WM, Spaan WJ, Middeldorp JM. Localization and diagnostic application of immunodominant domains of the BFRF3-encoded Epstein–Barr virus capsid protein. *J Infect Dis.* 1994;170:13–9.

Vidal F, Gutiérrez F, Gutiérrez M, Olona M, Sánchez V, Mateo G, et al. Pharmacogenetics of adverse effects due to antiretroviral drugs. *AIDS Rev.* 2010 Jan-Mar;12(1):15-30.

Vilchez RA, Finch CJ, Jorgensen JL, Butel JS. The clinical epidemiology of Hodgkin's lymphoma in HIV-infected patients in the HAART era. *Medicine (Baltimore).* 2003;82:77–81.

Vilchez RA, Kozinetz CA, Jorgensen JL, Kroll MH, Butel JS. AIDS related systemic non-Hodgkin's lymphoma at a large community program. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002;18:237–42.

Walling DM, Clarck NM, Markovitz DM, Frank TS, Braun DK, Eisenberg E, et al. Epstein-Barr virus coinfection and recombination in non-human immunodeficiency virus-associated oral hairy leukoplakia. *J Infect Dis.* 1995;171:1122-30.

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

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

Walling DM, Etienne W, Autumn JR, Flaitz CM, Nicholz CM. Persistence and transition of Epstein-Barr virus genotypes in the pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J Infet Dis.* 2004a;190:387-95.

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

Webster-Cyriaque J, Edwards RH, Quinlivan EB, Patton L, Wohl D, Raab-Traub N. Epstein-Barr Virus and Human Herpesvirus 8 Prevalence in Human Immunodeficiency Virus–Associated Oral Mucosal Lesions. *J Infect Dis.* 1997;175:1324–32.

Webster-Cyriaque J, Middeltorp J, Raab-Traub N. Hairy leukoplakia: an unusual combination of transforming and permissive Epstein-Barr virus infections. *J Virol* 2000;74:7610-18.

Webster-Cyriaque J, Raab-Traub N. Transcription of Epstein-Barr virus latent cycle genes in oral hairy leukoplakia. *Virology*. 1998;248:53–65.

Williams H, McAulay K, Macsween KF, Gallagher NJ, Higgins CD, Harrison N, et al. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol*. 2005;129:266–74.

Yao QY, Rickinson AB, Epstein MA. A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer*. 1985;35:35-42.

Young LS, Dawson CW, Brown KW, Rickinson AB. Identification of a human epithelial cell surface protein sharing an epitope with the C3d/Epstein-Barr virus receptor molecule of B lymphocytes. *Int J Cancer*. 1989;43:786-94.

Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. *Biochem Soc Trans*. 1999;27:807-12.

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.

Zimber U, Adldinger HK, Lenoir GM, Vuillaume M, Knebel-Doeberitz M, Laux G, et al. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 1986;154:56-66.

Apêndice A - Valores absolutos da cargas virais

Pacientes	CD4 mais baixo (cels/mm ³)	CD4 atual (cels/mm ³)	CV HIV	CV EBV ST (cópias/10μl)	CV EBV saliva (cópias/10μl)
1	236	238	0	0	266765
2	480	1100	0	125	0
3	286	493	0	2203	0
4	380	645	0	0	0
5	350	405	0	232	0
6	8	270	164000	9173	380000
7	0	464	0	39	171
8	300	500	0	0	39392
9	234	633	0	87	212303
10	234	707	0	21	90
11	130	230	0	52	154
12	81	577	0	38	13
13	280	525	0	0	225
14	471	711	0	136	3196
15	327	992	0	13	43527
16	90	323	0	0	57
17	120	360	0	464	8445
18	25	660	0	7024	0
19	10	190	10000	25	51001
20	423	831	0	76	23
21	135	734	0	0	40
22	0	1014	0	199	13351
23	748	953	0	17	0
24	200	908	0	0	0
25	236	400	190	107	0
26	40	70	0	272	0
27	150	150	16.487	68	603
28	25	660	0	90	96
29	123	850	0	0	36
30	150	271	447	304	302146
31	806	866	0	0	0
32	457	530	0	22	11
33	202	545	0	45	341
34	192	583	0	19	0
35	36	1107	0	0	0
36	9	490	0	5	1979
37	217	265	0	16	89729
38	385	445	0	98	12
39	540	540	0	0	0
40	160	220	0	4673	9910
41	500	900	0	37	102
42	4	780	0	0	28
43	50	746	250	9576	1725
44	33	1179	0	284	365
45	197	318	0	85	145
46	413	800	0	0	0

47	144	364	0	2470	178533
48	300	700	0	0	657
49	9	570	0	59	123
50	60	472	0	0	196
51	90	395	0	309	94474
52	20	114	200000	2176	171
53	200	921	0	0	78
54	304	316	0	0	0
55	40	87	13239	0	16
56	372	400	300	123	193172
57	219	1099	0	12	31
58	20	128	292	88	678179
59	271	436	9780	0	0
60	180	240	100000	70	416
61	96	255	0	359	0
62	273	374	0	37	0
63	300	1263	0	18	44
64	90	738	0	0	153
65	296	384	3630	0	0
66	360	396	0	0	0
67	406	800	0	0	513207
68	12	778	0	166	4316
69	280	475	0	5410	74401
70	100	700	0	41	97
71	63	567	0	44	0
72	400	524	39600	0	468085
73	526	609	0	4751	467596
74	100	314	0	1394	7
75	3	25	2600	4453	3901861
76	517	588	0	709	12790
77	11	232	0	50	582
78	6	156	0	69	65
79	nunca fez	nunca fez	nunca fez	30	0
80	236	440	197	8,5	20
81	13	495	0	68	0
82	139	139	0	76	0
83	384	697	0	23575	42732
84	380	380	0	0	955
85	60	60	8817	4190	252209
86	230	1276	0	294	16733
87	177	746	0	93	529
88	50	580	0	22	46
89	50	364	0	0	41
90	504	607	0	0	38
91	200	520	0	30	85
92	217	217	132000	155	902668
93	20	500	0	97	333
94	195	224	0	74	401

Em vermelho: pacientes com LP

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa - FOU SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR - 229342
Protocolo 213/2008

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU, o protocolo de pesquisa: "**Detecção e quantificação na saliva e no sangue do Epstein-Barr vírus (EBV) em lesões de leucoplasia pilosa em pacientes soropositivos para o HIV**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) José Henrique Feijó Rosseto e sob orientação do Prof(a). Dr(a). Profa. Dra. Karem López Ortega.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 11 de dezembro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Parecer do Comitê de ética em Pesquisa - IMT

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066/8650 e 3064-5132 FAX: (55-11)
3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 02 de dezembro de 2009.

Ilma. Sra.
Karem López Ortega
Orientadora
(aos cuidados de José Henrique Feijó Rosseto)

A Comissão de Pesquisa e Ética do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião efetuada na presente data, analisou e aprovou o projeto de pesquisa **CEP-IMT 060/2009** "Detecção e quantificação na saliva e no sangue do Epstein-Barr Vírus (EBV) em lesões de leucoplasia pilosa em pacientes soropositivos para o HIV", sob a sua orientação.

Atenciosamente,

Dr. Paulo Cotrim

Vice-Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética em Pesquisa do IMT

Dr. Jorge Casseb

Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética em Pesquisa do IMT

ANEXO C - Termo de consentimento Livre e Esclarecido
Nº de registro no CEP FOU SP: 213/2008 FR- 229342

Deteção e quantificação na saliva e no sangue do Epstein-Barr vírus (EBV) de pacientes com e sem leucoplasia pilosa soropositivos para o HIV

Você está sendo convidado a participar da pesquisa sobre a presença do vírus Epstein-Barr em pacientes portadores do HIV.

O vírus Epstein-Barr (abreviado pelas letras EBV), é um vírus da família do herpes vírus e um dos mais comuns vírus presentes nos humanos, podendo estar presente em até 95% da população adulta. Ele pode permanecer no corpo sem demonstrar nenhum sintoma, porém, em indivíduos HIV positivos ele pode causar uma lesão chamada de Leucoplasia Pilosa Oral (abreviado como LP). O objetivo desse estudo é avaliar a presença da lesão de leucoplasia pilosa e medir a quantidade do EBV no seu sangue e na sua saliva, pois pode ser que a presença de LP esteja vinculada à quantidade do vírus circulante no sangue e na saliva, e este trabalho pretende avaliar essa relação. Sua participação não é obrigatória e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não lhe trará nenhum prejuízo em seu atendimento no CAPE, que não será interrompido de maneira alguma, ou em sua relação com o pesquisador.

As informações abaixo são para esclarecer e pedir sua participação voluntária neste estudo. Você será examinado pelo dentista que fará esta pesquisa e responderá algumas perguntas relativas à doença do HIV.

Para saber se existe o vírus (EBV) no seu sangue, e na sua saliva, teremos de coletar amostras no sangue e na saliva. A saliva é coletada diretamente da sua boca num recipiente de plástico. Para colher o sangue, será utilizado uma agulha, e o procedimento é igual ao que você já faz em hospital rotineiramente. Essa coleta de sangue será feita por uma enfermeira treinada e como já foi dito antes, você não vai ter que se deslocar. Para cada análise sangüínea serão coletadas 5 ml de sangue. Se houver a presença da leucoplasia pilosa na língua, no momento do exame, iremos realizar uma biópsia, que consiste em retirar um pequeno fragmento de sua língua para enviar ao laboratório e confirmar o diagnóstico. Esse procedimento será realizado com o uso de anestesia local, e não apresenta nenhum risco à sua saúde, apenas um leve desconforto poderá ser sentido nos 2 primeiros dias após o procedimento. A leucoplasia pilosa é uma lesão causada pela reprodução do vírus EBV, que se apresenta como uma faixa branca, que geralmente ocorre na borda (nos lados) da língua e que não é possível remover com nenhum tipo de raspagem. A leucoplasia pilosa é uma das mais importantes manifestações do HIV, e seu diagnóstico é importante, pois pode indicar que a imunidade do portador do HIV está baixa e essa baixa pode significar que a terapia antiretroviral não está funcionando muito bem. Esse procedimento é executado em qualquer paciente com suspeita dessa lesão, mesmo que ele não participe dessa pesquisa, pois essa lesão precisa ser diagnosticada para que sejam tomadas as devidas providências, como a troca da medicação antiviral em uso.

Para isso é necessário você dar o seu consentimento por escrito. A participação não trará gasto a você, mas as informações obtidas poderão beneficiá-lo com orientações futuras em relação ao seu tratamento. Se diagnosticado algum problema, este será encaminhado para tratamento adequado, no próprio CAPE. As consultas e os procedimentos realizados

durante o estudo serão inteiramente gratuitos. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem que isso afete o seu tratamento no CAPE.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone do pesquisador principal e de sua orientadora, que deverão esclarecê-lo a respeito de quaisquer dúvidas que possam surgir. Caso isso ocorra ligue para José Henrique Feijó Rosseto (pesquisador), no telefone (81516761) ou para a ProfªDrª Karem López Ortega no telefone 3091-7902 ou poderá ligar para o Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP no telefone (3091-7960).

O Pesquisador compromete-se em utilizar os dados obtidos e o material colhido somente nesse estudo que você escolheu participar, sendo que as informações obtidas não serão utilizadas para divulgar sua identidade, que será mantida em sigilo absoluto.

AUTORIZAÇÃO

Após ler estas informações e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador, que as respondeu de forma clara e simples, concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

_____
assinatura do paciente

São Paulo, .../...../.....

RG: _____

Nome: _____

Endereço: _____

Fone: _____

_____
assinatura do pesquisador

São Paulo, .../...../.....

ANEXO D – Ficha Clínica

Número CAPE _____

Nome: _____

Sexo: Masc( ) Fem( )

Idade: _____

Raça _____

Data da avaliação: /   /

Data de nascimento: /   /

Categoria de exposição ao HIV: UDI( ) Hétero( ) HSH( ) Transfusão( )
Vertical ( ) Não sabe( )Doenças sistêmicas até o momento: Toxoplasmose( ) Leishmaniose ( )
Pneumonia( ) Tuberculose ( ) Meningite( ) Sífilis( ) Herpes Zoster( ) CMV( )
Anemia ( ) Outras( )

Quais _____

Lesões bucais no momento do exame: Candidíase( ) LP( ) Linfoma( ) Herpes( )
Geng necros( ) Period necros( ) SK( ) Aftas( ) Pigmentação( ) Condiloma
acuminado( ) Eritema gengival linear( ) Queilite angular ( ) Outras( ) Quais

Tipo de associação ARV utilizada:

Tempo de uso _____

( ) ITRN+ITRN

( ) ITRN+IP

( ) ITRN+ITRNN

( ) ITRN+ IP+ ITRNN

Medicações em uso:

Taxa CD4 mais baixa registrada: _____

Taxa CD4 atual: _____

Carga viral: _____

Uso álcool: não ( ) sim ( ) quantidade/freqüência: _____

Tabaco: sim( ) não ( )

Observações