

PAULO HENRIQUE BRAZ DA SILVA

**DETECÇÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) POR MEIO DA
TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* EM LESÕES SUGESTIVAS DE
LEUCOPLASIA PILOSA**

São Paulo

2005

Paulo Henrique Braz da Silva

**Detecção do vírus Epstein-Barr (EBV) por meio da técnica de
hibridização *in situ* em lesões sugestivas de 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. Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães

São Paulo

2005

FOLHA DE APROVAÇÃO

Braz-Silva PH. Detecção do vírus Epstein-Barr (EBV) por meio da técnica de hibridização *in situ* em lesões sugestivas de leucoplasia pilosa [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, 19 de dezembro de 2005

Banca Examinadora

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

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

À minha irmã Juliana, pelo carinho, amizade, compreensão e estímulo constantes. Obrigado por estar sempre ao meu lado. Te amo!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini Magalhães, agradeço em primeiro lugar a confiança depositada em meu trabalho, desde a iniciação científica. Obrigado pelo apoio, pelas correções, críticas, estímulo e principalmente por sempre me fazer acreditar ser capaz. Ser seu orientado é um grande presente.

Ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo, pelo exemplo, pela oportunidade e confiança oferecido, possibilitando a realização e conquista deste curso.

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

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

À Profa. Dra. Telma, pelos ensinamentos e por ter aberto as portas da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz de maneira tão prestativa e carinhosa.

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

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

À amiga Karen Renata Nakamura Hiraki, obrigado por tudo, pela ajuda acadêmica e por todos os momentos de risos largos que tivemos juntos. “Os amigos são irmãos que Deus nos permite escolher”. Ter sua amizade é um grande privilégio.

À amiga Natalie Pepe Rezende, pela amizade, ajuda e estímulo. Sua participação nesse trabalho foi imprescindível.

Ao amigo Sérgio de Melo Alves Jr., pela análise estatística do trabalho.

Silvan, obrigado pela amizade, companheirismo e compreensão.

A todos os meus amigos e amigas, em especial a Ilka, Paulinha, Claudiney, Aylton, Maria Lucia, Karen, Flávia e Mariana. Vocês são parte essencial da minha vida. Obrigado por estarem sempre presentes.

À Edna e Elisa, pelos ensinamentos da parte laboratorial e do processamento do material utilizado para realização deste trabalho.

À Zilda, Néia, Nair, Patrícia e Bia pela amizade, disponibilidade, paciência e competência.

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

Ser Feliz!

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo... "

Fernando Pessoa

MAR PORTUGUÊS

*Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal!
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram!*

*Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar!
**Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.***

*Quem quere passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.*

Fernando Pessoa

Braz-Silva, PH. Detecção do vírus Epstein-Barr (EBV) por meio da técnica de hibridização *in situ* em lesões sugestivas de leucoplasia pilosa [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um herpes vírus humano que estabelece infecção persistente e está associado com várias doenças, como mononucleose infecciosa, linfomas, carcinoma de nasofaringe e leucoplasia pilosa, afetando principalmente pacientes imunossuprimidos. Leucoplasia pilosa é uma lesão epitelial não maligna associada ao EBV que ocorre principalmente nas bordas laterais de língua. É comum em indivíduos infectados pelo HIV e em pacientes que recebem medicações imunossupressoras. Histopatologicamente, a leucoplasia pilosa é caracterizada por hiperparaqueratose, acantose, células semelhantes a coilócitos ou células balonizantes, e discreto ou nenhum infiltrado inflamatório. As características histopatológicas da lesão não são patognomônicas, sendo necessária a detecção do EBV para o diagnóstico final de acordo com vários autores. O objetivo desse estudo foi verificar a presença do EBV, por meio da técnica de hibridização *in situ*, em lesões diagnosticadas histologicamente como sugestivas de leucoplasia pilosa e comparar esses resultados com algumas características histopatológicas. Trinta e seis espécimes foram selecionados do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal. Todos foram submetidos à reação de hibridização *in situ*, e 27 casos (75%) foram positivos, confirmando o diagnóstico anterior. Nenhuma das características histológicas analisadas puderam se correlacionar com a hibridização

in situ. Podemos concluir que a análise histopatológica ao H&E não pode substituir a hibridização *in situ* no diagnóstico final da leucoplasia pilosa.

Palavras-Chave: Leucoplasia pilosa - vírus Epstein-Barr (EBV) - hibridização *in situ* - diagnóstico histopatológico – diagnóstico molecular

Braz-Silva PH. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) by *in situ* hybridization in lesions like oral hairy leukoplakia [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus that establishes persistent infection and is associated with many diseases, including infectious mononucleosis syndrome, lymphomas, nasopharyngeal carcinoma, and oral hairy leukoplakia, affecting principally immunocompromised patients. Oral hairy leukoplakia is a non-malignant, EBV-associated, epithelial disease that typically occurs on the lateral tongue borders. It is common in individuals with HIV infection and in patients receiving iatrogenic immunosuppression. Histologically, hairy leukoplakia is characterized by shaggy hyperparakeratosis, acanthosis, "koilocyte"-like or balloon cells, and a paucity of inflammation. The histological features of hairy leukoplakia are not pathognomonic, and for many authors definitive diagnosis requires demonstration of EBV. The aim of this study was to verify the presence of EBV, by *in situ* hybridization, in lesions diagnosed histologically suggestive of hairy leukoplakia and compare these results with histological features. Thirty-six biopsy specimens from lesions histologically suggestive of hairy leukoplakia were selected from the Department of Stomatology's Oral Pathology Service archives. EBV *in situ* hybridization was performed on all 36 cases, and 27 cases (75%) were positive, confirming the diagnosis of oral hairy leukoplakia. Histopathological features did not agree well with EBV *in situ* hybridization. We concluded that H&E histopathology

should not be used as a substitute for in situ hybridization in the definitive diagnosis of hairy leukoplakia.

keywords: oral hairy leukoplakia – Epstein-Barr virus (EBV) – *in situ* hybridization – histopathologic diagnostic – molecular diagnostic

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Características clínicas da leucoplasia pilosa	28
Figura 5.1- Características histopatológicas e hibridização <i>in situ</i> de leucoplasia pilosa (A, B, C e D)	52
Figura 5.2 -Características histopatológicas e hibridização <i>in situ</i> de lesão sugestiva de leucoplasia pilosa (A,B, C e D).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Informação sobre a soropositividade dos pacientes para o HIV	49
Tabela 5.2 - Localização anatômica das lesões.....	50
Tabela 5.3 - Características histopatológicas descritas	51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

EBV Vírus Epstein-Barr

HHV-4 Herpes vírus humano 4

HIV Vírus da imunodeficiência humana

PCR *Polymerase chain reaction* (Reação da polimerase em cadeia)

H&E Hematoxilina e eosina

gp glicoproteína

EBNA *Epstein Barr nuclear antigen* (antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr)

LMP *Latent Membrane Protein* (proteína de membrana do ciclo latente)

EBER *Epstein Barr encoded RNA* (sequencia de RNA não codificada do EBV)

DNA ácido desoxirribonucléico

RNA ácido ribonucléico

VCA Virus Capside antigen (antígeno do capsídeo viral)

CDC *Central Diseases Control* (Centro de Controle de Doenças)

AIDS síndrome da imunodeficiência humana

NaCl cloreto de sódio

pH potencial hidrogeniônico

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	microlitro
mg	miligramo
μm	micrometro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
mm^3	milímetro cúbico

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Vírus Epstein-Barr (EBV).....	22
2.2 Leucoplasia Pílosa – características clínicas e histopatológicas	28
2.3 Diagnóstico.....	36
2.4 Tratamento.....	40
3 PROPOSIÇÃO	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Reação de hibridização <i>in situ</i>	44
4.2 Características histopatológicas.....	47
4.3 Análise Estatística.....	47
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) pertence ao grupo do herpes vírus (HHV-4), e infecta aproximadamente 90% da população mundial adulta de forma assintomática (FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000; CRAWFORD, 2001; RICKINSON; KIEFF, 1996). O EBV está envolvido na patogênese da mononucleose infecciosa, alguns tumores malignos de origem linfóide e epitelial, como linfoma de Burkitt, linfoma imunoblástico, linfoma de Hodgkin, carcinoma de nasofaringe e leucoplasia pilosa (CRUCHLEY et al., 1997; WALLING et al., 2004a; WALLING et al., 2003; FAHRAEUS et al., 1990; PEGTEL; MIDDELDORP; THORLEY-LAWSON, 2004; RYON et al., 1993; MILLER, 1990; HILLE et al., 2002; RAAB-TRAUB; WEBSTER-CYRIAQUE, 1997). O vírus latente infecta linfócitos B circulantes, e embora essa infecção quase sempre seja controlada em níveis subclínicos, em determinadas condições, como o estado de imunossupressão do paciente, o EBV está associado à neoplasias malignas (CRAWFORD, 2001; FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000).

A leucoplasia pilosa é uma lesão benigna da mucosa oral que acomete principalmente a borda lateral de língua, caracterizada pela replicação do EBV nas camadas superficiais do epitélio (WALLING et al., 2003; RAAB-TRAUB; WEBSTER-CYRIAQUE, 1997). Foi descrita inicialmente como exclusivamente associada à AIDS (GREENSPAN et al., 1984), porém, posteriormente à sua descrição, alguns casos foram diagnosticados em pacientes HIV-negativos transplantados de órgãos sólidos (GREENSPAN et al., 1989; MACLEOD; LONG; SOAMES, 1990; SEYMOUR et al., 1997) ou imunossuprimidos cronicamente por outras razões (MIRANDA; LOZADANUR, 1996).

Clinicamente, a leucoplasia pilosa apresenta-se como uma placa branca, corrugada, indolor, que não sede à raspagem, mais comumente encontrada em borda lateral de língua. O diagnóstico diferencial se faz com hiperparaqueratose, candidíase hiperplásica, líquen plano, nevo branco esponjoso, leucoplasia idiopática ou associada ao tabaco e glossite migratória (MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993; SCHULTEN et al., 1991; TRIANTOS et al., 1997). Apresenta quadro histopatológico não patognomônico, caracterizado por hiperqueratose, degeneração balonizante, acantose e discreto infiltrado inflamatório (WALLING et al., 2004a,b; MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993; GREENSPAN et al., 1989).

O critério utilizado para o diagnóstico final da leucoplasia pilosa tem sido motivo de especulação. Alguns autores preconizavam que apenas as características clínicas associadas aos achados histopatológicos seriam suficientes para fechar o diagnóstico (SHIBOSKY, 1987). Outros, defendem a idéia de que é necessária a demonstração do material genético do EBV nas células epiteliais (DE SOUZA; GREENSPAN; HAMMER, 1986; EC-CLEARINGHOUSE, 1993; GREENSPAN et al., 1998). A detecção do vírus pode ser feita através de diversas técnicas como a PCR (*polimerase chain reaction*), hibridização *in situ*, imunoistoquímica, imunocitoquímica e microscopia eletrônica (SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1993; MABRUK et al., 1994; MABRUK et al., 1996; LANGFORD et al., 1992; WALLING et al., 2003).

Em algumas situações fica inviável a realização de técnicas complementares para detecção do vírus, por questões financeiras ou de estrutura laboratorial do serviço de diagnóstico, o que tem levado a um diagnóstico baseado apenas nas características histopatológicas da lesão (GREENSPAN et al., 1998). Seguindo esses postulados, o Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP vinha, até então,

estabelecendo o diagnóstico sugestivo de leucoplasia pilosa, baseando-se nas alterações histopatológicas observadas ao H&E.

Mesmo com o quadro histopatológico característico, estudos mais recentes tem defendido a idéia de que o diagnóstico final de leucoplasia pilosa só é possível com a detecção do EBV, sendo o padrão ouro para esta detecção a técnica de hibridização *in situ* (EC-CLEARINGHOUSE, 1993; GREENSPAN et al., 1998; LOUGHREY et al., 2004;).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vírus Epstein-Barr (EBV)

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

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

Em pacientes imunocompetentes portadores do EBV, pode haver o estabelecimento de uma infecção persistente e de longa duração. Há a liberação constante ou intermitente do vírus através da saliva, infectando outros indivíduos através do contato oral. A infecção primária normalmente ocorre na adolescência, que em aproximadamente 30-50% dos casos causam a mononucleose infecciosa.

Essa associação de idade e desenvolvimento da mononucleose infecciosa não está muito clara, sendo sugerido como principal fator a carga viral de contágio. As doses virais ingeridas por crianças em contato com objetos contaminados seriam muito menores do que as ingeridas por adultos jovens através do beijo. Além disso, o EBV foi detectado em secreções do trato genital feminino e masculino, justificando a possibilidade da infecção pelo contato sexual (RICKINSON; KIEFF, 1996)

O EBV tem dois tipos celulares como alvo: linfócitos B e células epiteliais (PEGTEL; MIDDELDORP; THORLEY-LAWSON, 2004; LI et al., 1992). A capacidade do EBV em infectar linfócitos é vista na detecção freqüente do vírus em linfomas de Burkitt e também em sua capacidade em transformar linfócitos B periféricos em uma linhagem celular linfoblastóide de crescimento contínuo. A infecção do células epiteliais pode ser observada em aproximadamente todos os casos de carcinoma de nasofaringe, em alguns casos de carcinoma de estômago e pela detecção da fase replicante do vírus em lesões de leucoplasia pilosa (GREENSPAN et al., 1985; RICKINSON; KIEFF, 1996).

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

poliadeniladas (EBER 1 e 2), sendo essas também expressas no ciclo produtivo (RICKINSON; KIEFF, 1996).

Podem ser reconhecidos três tipos de latência dependendo da variedade de expressão dos genes. A latência III (Lat III) está presente em linhagens celulares linfoblastóides, sendo as outras duas formas associadas à neoplasias. Nos linfomas de Burkitt somente as EBERs e EBNA 1 são regularmente expressas (Lat I), enquanto que em linfomas de Hodgkin e carcinomas de nasofaringe as LMPs são também expressas (RICKINSON; KIEFF, 1996).

A mudança da fase latente para a fase lítica é precedida pela expressão da proteína BZLF1 (ZEBRA), um produto gênico imediato. Essa proteína age na ativação do gatilho para a replicação viral e também estimula outras proteínas como BHRF1, responsável pela produção da DNA polimerase viral e da timidina quinase, que são importantes para a replicação do DNA viral (RICKINSON; KIEFF, 1996). Finalmente produtos gênicos mais tardios são sintetizados, incluindo componentes estruturais dos vírions, como o antígeno do capsídeo viral (VCA) e a glicoproteína de envelope gp350 (STRAUS et al., 1993).

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

A presença do EBV em carcinomas de nasofaringe, a detecção do vírus no ciclo replicativo em células epiteliais da orofaringe de pacientes com mononucleose infecciosa e em lesões de leucoplasia pilosa, levaram a crer num papel central do epitélio orofaríngeo na infecção primária e persistente do EBV. Levantou-se a hipótese de que o alvo primário do EBV seriam as células epiteliais. De acordo com

esse modelo, o vírus poderia replicar-se nas camadas mais diferenciadas do epitélio e persistir na camada basal, sendo a infecção dos linfócitos B um evento secundário (CRAWFORD, 2001).

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

Em estudo com pacientes portadores de um defeito genético raro (agamaglobulinemia ligada ao X, XLA), buscou-se mostrar o papel dos linfócitos B e de células epiteliais na infecção primária pelo EBV. Essa deficiência é resultado de uma mutação herdada no gene da tirosina quinase, que impede a maturação das células B. Por meio do uso da PCR para detecção do DNA viral, observou-se que nenhum dos nove pacientes analisados mostravam evidência do EBV na saliva ou no sangue. Além disso, apesar da resposta imune mediada por linfócitos T estar presente em pacientes com XLA, nenhum apresentava células T específicas, que foram facilmente detectáveis em todos os pacientes EBV soropositivos do grupo controle (FAULKNER; KRAJEWSKY; CRAWFORD, 2000). Esses resultados sugerem que, na ausência de linfócitos B, células epiteliais não podem ser responsáveis pela infecção primária do EBV (CRAWFORD, 2001).

Existem poucas evidências que sustentem a hipótese de que a infecção latente do EBV seja um evento freqüente em células epiteliais. Na leucoplasia pilosa, o melhor modelo para 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 (CRUCHLEY et al, 1997; HERRMANN et al, 2002; FARIA et al, 2005; WALLING et al, 2004c).

A replicação do EBV pode ocorrer em células epiteliais normais, sugerindo assim que a replicação é insuficiente para a patogênese da leucoplasia pilosa e que alguns cofatores são necessários (WALLING et al., 2001). Alguns genes do ciclo latente são expressos durante a replicação do EBV na leucoplasia pilosa, e alguns deles expressos de forma concomitante na mesma célula epitelial (WEBSTER-CYRIAQUE; MIDDELDORP; RAAB-TRAUB, 2000). A expressão de genes latentes durante o ciclo replicativo do EBV em células epiteliais podem ser os cofatores necessários para a patogênese da leucoplasia pilosa (WALLING et al., 2001; WEBSTER-CYRIAQUE ; MIDDELDORP; RAAB-TRAUB, 2000). Estudo de Walling et al constatou que a expressão de EBNA-2 em células epiteliais é um importante cofator associado com a patogênese da leucoplasia pilosa. A expressão desses genes se dá apenas nas camadas superficiais do epitélio (WALLING et al., 2004c).

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

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

O carcinoma epidermóide de boca também tem sido relacionado ao EBV por alguns autores, porém não sendo estabelecido claramente o seu papel na carcinogênese em células epiteliais da cavidade oral (KOBAYASHI et al., 1999; SHIMAKAGE et al., 2002; SAND et al., 2000; CRUZ et al., 1997).

Linfomas não-Hodgkin, principalmente em pacientes infectados pelo vírus HIV, tem sido relacionados com o EBV. Em estudo de Iamaroon et al constatou-se a expressão de EBER em 4 dos 10 casos analisados (40%), sendo em todos os casos de pacientes HIV positivos houve detecção do EBV (IAMAROON et al., 2003).

O EBV também tem sido estudado quanto ao seu envolvimento na doença periodontal (SLOTS, 2005). Vários trabalhos apontam para a alta prevalência na detecção dos vírus herpes em lesões periodontais, levantando-se a hipótese de seu envolvimento na patogênese da lesão, porém não sendo estabelecido seu mecanismo de ação. Estudo de Saygun et al observou a presença do EBV em 72% dos casos de periodontite agressiva e 6% em pacientes sem doença periodontal (SLOTS, 2005).

2.2 Leucoplasia Pilosa – características clínicas, histopatológicas e etiopatogenia

A leucoplasia pilosa foi relatada pela primeira vez em 1984, por um grupo de pesquisadores norte-americanos da Universidade da Califórnia. O estudo foi realizado num grupo de 37 pacientes homossexuais e bissexuais masculinos imunossuprimidos pelo HIV (GREENSPAN et al., 1984).

A condição foi descrita como uma lesão branca, acometendo principalmente as bordas laterais da língua, podendo ser uni ou bilateral, sem limites precisos, apresentando superfície plana, corrugada ou pilosa, não removida quando raspada, com tamanho bastante variável (figura 2.1). Quando de sua descrição, pensou-se inicialmente em uma lesão associada exclusivamente à infecção pelo HIV (GREENSPAN et al., 1984).



Figura 2.1 - Aspecto clínico da leucoplasia pilosa

Desde sua descrição em 1984 até o ano de 1989, a lesão foi diagnosticada exclusivamente em pacientes homossexuais ou bissexuais masculinos acometidos pelo HIV (GREENSPAN; GREENSPAN, 1992).

Em 1989 houve o primeiro relato de leucoplasia pilosa em paciente comprovadamente HIV negativo. Tratava-se de um paciente transplantado renal imunossuprimido cronicamente para evitar a rejeição do órgão transplantado. O diagnóstico definitivo da lesão foi realizado em bases moleculares, com a detecção do EBV por meio de hibridização *in situ* (GREENSPAN; GREENSPAN, 1989).

Posteriormente, inúmeros casos de leucoplasia pilosa foram descritos em pacientes HIV negativos, imunossuprimidos por outras razões como transplantados de órgãos sólidos (ITIN et al., 1988; MACLEOD; LONG; SOAMES, 1990; KING et al., 1994; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997; SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1993), lúpus eritematoso sistêmico (MIRANDA; LOZADA-NUR, 1996), leucemia mieloblástica (SYRJÄNEN et al., 1989), levando a conclusão de que a leucoplasia pilosa estava associada à imunossupressão de um modo geral, não exclusivamente associada à infecção pelo HIV (ITIN et al., 1988; SYRJÄNEN et al., 1989). Pouquíssimos casos de leucoplasia pilosa foram descritos em pacientes imunocompetentes (WURAPA et al., 1999).

Em pacientes HIV negativos, o principal grupo afetado pela leucoplasia pilosa é o de transplantados de órgãos sólidos (SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1993; KING et al., 1994; SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

Em levantamento realizado com um grupo de 159 pacientes transplantados renais, usuários de ciclosporina A, com relação à prevalência aos fatores de risco às infecções oportunistas da cavidade oral, 11,3% dos pacientes apresentaram lesões

de leucoplasia pilosa, sendo a segunda lesão mais freqüente no grupo. O período de observação clínica foi do segundo mês do transplante até 5 anos pós transplante (KING et al., 1994).

Uma metanálise com vários trabalhos de pesquisa em pacientes transplantados renais e cardíacos, usuários do imunossupressor ciclosporina A, revelou que 30% dos pacientes transplantados apresentaram leucoplasia pilosa. O período de início da lesão variou de 3 a 4 meses após o início da terapia imunossupressora (SEYMOUR; THOMASON; NOLAN, 1997).

O local de predileção de ocorrência da leucoplasia pilosa é a borda lateral de língua, podendo ser uni ou bilateral (GREENSPAN et al., 1984; GREENSPAN; GREENSPAN 1992; SOUTHAM et al., 1991; RABANUS et al., 1991; REICHART et al., 1989; SCHMIDT-WESTHAUSEN, 1993; FARIA et al., 2005). Porém, muito raramente, outros locais da mucosa oral tem sido acometidos pela lesão, como região retromolar, mucosa labial, assoalho de boca e palato mole (SCHIODT et al., 1987; TRIANTOS et al., 1997; SOUTHAM et al., 1991; GREENSPAN et al., 1989). A única região afetada pela leucoplasia pilosa é a mucosa oral, não sendo descritos casos em outras mucosas como laringe, esôfago, ânus, vagina ou pele (GREENSPAN et al., 1989).

A partir de 1989 houve uma mudança no perfil demográfico em pacientes diagnosticados com leucoplasia pilosa. Os primeiros relatos da lesão em pacientes imunossuprimidos por outras razões datam dessa época (GREENSPAN et al., 1989; ITIN et al., 1988). No grupo de pacientes HIV positivos também houve uma mudança, sendo a lesão diagnosticada também em receptores de transfusão sangüínea, usuários de drogas injetáveis, hemofílicos e mulheres (SCIUBBA et al., 1989).

Estudos mostram que a leucoplasia pilosa é uma das lesões oportunistas mais freqüentes em pacientes HIV positivos, sendo menos freqüente apenas que a candidíase na maioria dos levantamentos realizados, com uma prevalência de aproximadamente 20% (PATTON et al., 1998; ARENDORF et al., 1998; RAMIREZ-AMADOR et al., 1998; TSANG; SAMARANAYAKE, 1999; MARGIOTTA et al., 1999).

Há uma forte predileção da lesão pelo sexo masculino em idade adulta, sendo bastante rara em crianças, não apresentando casuística considerável (MAGALHÃES et al., 2000; PORTELA et al., 2002; FERGUSON et al., 1993; LASKARIS; LASKARIS; THEODORIDOU, 1995). A partir da década de 90, observa-se um número crescente de mulheres portadoras da leucoplasia pilosa (SHIBOSKI, 1997; MAGALHÃES, 2000).

A leucoplasia pilosa é na grande maioria das vezes assintomática, podendo apresentar, em alguns casos, principalmente na língua, ardência, normalmente associada a presença de hifas de *Candida sp* (EVERSOLE et al., 1986; SCHIODT et al., 1987; MCCULLOUGH; FIRTH; READE, 1997).

Classificada como uma lesão freqüentemente associada à infecção pelo HIV (GREENSPAN; GREENSPAN, 1989; SCHULTEN et al., 1991; ECCLEARINGHOUSE, 1993), a leucoplasia pilosa é considerada uma manifestação fortemente relacionada com a doença e incluída na Categoria B da classificação do CDC (CDC, 1993).

Pacientes com leucoplasia pilosa tem um prognóstico desfavorável no curso da infecção pelo HIV. Indivíduos HIV positivos, que desenvolveram a lesão, apresentando uma contagem de células TCD4 menor que 300/ μ l, têm prognóstico ruim. Observou-se também a diminuição no tempo de sobrevivência, com relação a outros pacientes HIV positivos não portadores de leucoplasia pilosa, com a mesma

contagem de células TCD4 (MELNICK; HANNAN; DECHER, 1991; HUSAK; GARBE; ORFANOS, 1996).

A leucoplasia pilosa é considerada um sinal de agravamento da imunossupressão, sendo preditiva para o desenvolvimento da AIDS, podendo seu diagnóstico ser usado como indicador para a detecção precoce da infecção pelo HIV e também como prognóstico para os casos já confirmados (HUSAK; GARBE; ORFANOS, 1996; TRIANTOS et al., 1997; RAVINA et al., 1996; MARGIOTTA et al., 1999; MCCULLOUGH; FIRTH; READE, 1997).

Com a introdução da HAART a partir de 1996, observou-se um declínio de algumas infecções oportunistas da cavidade oral, principalmente da candidíase e da leucoplasia pilosa, e um aumento nas lesões de condiloma acuminado. O surgimento dessas lesões está associado à baixas contagens de células TCD4+ e alta carga viral do HIV, demonstrando assim agravamento do estado de imunossupressão do paciente (GREENSPAN et al., 2001; EYESON et al., 2002; TAPPUNI; FLEMING, 2001; NICOLATOU-GALITIS et al., 2004; GREENSPAN et al., 2004; CHATTOPADHYAY et al., 2005, MARCUS et al., 2005).

O quadro histopatológico da leucoplasia pilosa é caracterizado por hiperplasia epitelial, projeções de queratina, paraqueratose, acantose e presença de células balonizantes na porção média ou superficial da camada espinhosa e escasso ou nenhum infiltrado inflamatório na lâmina própria subjacente (GREENSPAN et al., 1984; GREENSPAN; GREENSPAN, 1989; SCHIODT et al., 1987; GREENSPAN et al., 1998; GREEN et al., 1989; SOUTHAM et al., 1991; RABANUS et al., 1991).

A presença de hifas de *Candida* no epitélio da lesão tem sido um achado bastante freqüente (REICHART et al., 1989; SOUTHAM et al., 1991; FRAGA-FERNANDEZ; VICANDO-PLAZA, 1992; MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993;

EVERSOLE et al., 1986), variando sua detecção em 26,1% dos casos (FICARRA; BARONI; GAGLIOTI, 1988) até 100% (BELTON; EVERSOLE, 1986).

Uma característica bastante marcante no quadro histopatológico da leucoplasia pilosa é a presença de células epiteliais com inclusões nucleares descritas como Cowdry tipo A (semelhantes às células infectados pelo herpes vírus), que são inclusões eosinofílicas circundadas por um halo claro (FOWLER; REED; BRANNON, 1989; FRAGA-FERNANDEZ; VICANDI-PLAZA, 1992).

Núcleos em vidro fosco , que são núcleos com cromatina caracteristicamente marginal e inclusões eosinofílicas e basofílicas que conferem um padrão homogêneo a toda superfície nuclear, também foram descritos como característicos da lesão (FRAGA-FERNANDEZ; VICANDI-PLAZA, 1992; MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993). Outra alteração nuclear descrita na lesão foi uma condensação nodular de cromatina ao longo da membrana nuclear, característico da célula epitelial infectada por EBV, condição denominada de “núcleo em colar” (nuclear beading) (MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993).

O quadro histopatológico da leucoplasia pilosa, isoladamente, não pode ser considerado como diagnóstico definitivo, pois algumas outras lesões da mucosa oral apresentam quadro clínico e histopatológico semelhantes, como as chamadas falsas leucoplasias pilosas (GREEN et al., 1989).

Nas primeiras descrições da leucoplasia pilosa, os autores acreditavam que a lesão seria uma forma de candidíase. Porém , a hipótese da *Candida* como agente etiológico da lesão logo foi descartada, pois os pacientes não respondiam ao tratamento com drogas antifúngicas (GREENSPAN et al., 1984; GREENSPAN; GREENSPAN, 1992). Pela análise histopatológica, por apresentar células epiteliais com efeitos citopáticos semelhantes aquelas contaminadas pelo HPV, pensou-se na

possibilidade do vírus como agente etiológico, porém não houve sua detecção por técnicas de biologia molecular como a hibridização *in situ* (EVERSOLE et al., 1986; GREENSPAN et al., 1984).

O agente etiológico da leucoplasia pilosa ficou bem estabelecido com estudos envolvendo hibridização *in situ*, nos quais a detecção do EBV se fez em todos os casos analisados (GREENSPAN et al., 1987; DE SOUZA; GREENSPAN; HAMMER, 1986).

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

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

(MAURMANN et al., 2003; FAFIKRAMER et al., 2005; FRIAS et al., 2001; WALLING; FALITZ; NICHOLS, 2003; DIAZ-MITOMA et al. , 1990) e saliva (IDESAWA et al., 2004; IKUTA; HOSHIKAWA; SAIRENJI, 2000).

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

As lesões de leucoplasia pilosa apresentam os dois tipos de EBV, tipo 1 e 2 (GREEN et al., 2002; WALLING et al., 2004b), sendo que há um intercâmbio entre partículas virais de EBV de queratinócitos da lesão e células B periféricas (GREEN et al., 2002; PALEFSKY et al., 2002; LAGENAUR; PALEFSKY 1999), não havendo assim uma separação entre esses dois compartimentos.

A leucoplasia pilosa é caracterizada pelo ciclo replicativo do EBV nas camadas superficiais do epitélio. Porém alguns autores não acham suficiente o ciclo replicativo produtivo para explicar a patogênese da lesão (WALLING et al., 2001). Trabalhos mostram que, a expressão de genes do ciclo latente, seriam importantes cofatores no desencadeamento da lesão (CRUCHLEY et al., 1997; WALLING et al, 2004c). Mesmo com a expressão de genes do ciclo latente, estes só foram expressos nas camadas superficiais do epitélio (WALLING et al, 2004c).

2.3 Diagnóstico

A leucoplasia pilosa tem como principais características clínicas ser uma placa branca, de superfície corrugada ou lisa, não cede quando raspada, com extensão variando de milímetros a centímetros, não apresentando na grande maioria dos casos qualquer sintomatologia (GREENSPAN et al., 1984). Os aspectos clínicos são característicos porém não patognomônicos da lesão (GREEN et al., 1989).

Os diagnósticos diferenciais para a leucoplasia pilosa incluem a candidíase hiperplásica, líquen plano, nevus branco esponjoso, leucoplasia idiopática ou associada ao tabaco, a hiperqueratose traumática e a glossite migratória (SCHULTEN et al., 1991; TRIANTOS et al., 1997).

O diagnóstico da leucoplasia pilosa, segundo um grupo de autores, pode ser firmado apenas em bases clínicas, pois o quadro apresenta características bastante peculiares, sendo suficientes nos casos em que se conhece a soropositividade para o HIV do paciente (EVERSOLE et al., 1986; SCHIODT et al., 1987; TRIANTOS et al., 1997).

Porém, alguns autores, acreditam que o diagnóstico deva ser firmado em bases clínicas e histopatológicas, pois apenas o quadro clínico da lesão não é suficientemente específico para o diagnóstico (SHIBOSKY, 1987).

O quadro histopatológico da leucoplasia pilosa é caracterizado por hiperparaqueratose e acantose, presença de células balonzantes na camada espinhosa (núcleo picnótico e halo perinuclear), escasso ou nenhum infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente e atipia celular discreta em alguns casos (GREENSPAN et al., 1998; REICHART et al., 1989).

Outra característica freqüentemente encontrada no quadro histopatológico da leucoplasia pilosa é a presença de hifas de *Candida* nas camadas superficiais do epitélio, fato ocorrido em aproximadamente 50% dos casos (SCHIODT et al., 1987; GREEN et al., 1989).

Vários autores, analisando o quadro histopatológico da lesão, buscaram as características mais marcantes e freqüentes na tentativa de estabelecer padrões diagnósticos (SCHIODT et al., 1987; FRAGA-FERNÁNDEZ; BENITO; LIZALDEZ, 1990). Na análise histopatológica de 40 casos de leucoplasia pilosa, Schiodt et al observaram hiperparaqueratose em 100% dos casos, acantose (80%), projeções epiteliais (80%), coilocitose (98%), hifas de *Candida* (43%) e ausência de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente em 78% dos casos (SCHIODT et al, 1987). Fraga-Fernández et al., analisando 32 casos, chegaram a conclusões bastante semelhantes, havendo uma maior associação de hifas de *Candida* (71,8%) encontrada na série estudada. Nesse estudo foram descritas também alterações nucleares encontradas na leucoplasia pilosa (FRAGA-FERNÁNDEZ; BENITO; LIZALDEZ, 1990).

As características histopatológicas mais freqüentes na leucoplasia pilosa não são exclusivas da lesão, pois hiperparaqueratose e coilocitose podem ser observadas também na candidíase e em leucoplasias, que constituem diagnósticos diferenciais da lesão (EVERSOLE et al., 1986; REICHART et al., 1989).

Green et al, (1989), relataram 16 casos de lesões clinica e histologicamente semelhantes à leucoplasia pilosa diagnosticados em pacientes comprovadamente HIV negativos. Esses casos foram submetidos à hibridização *in situ* para a detecção do EBV, em que não se observou sua detecção em nenhum dos 16 casos. Os achados desse trabalho mostraram que o diagnóstico da leucoplasia pilosa não

poderia ser baseado em características histopatológicas apenas, sendo que a detecção do EBV através da hibridização *in situ* seria uma ferramenta imprescindível para o diagnóstico final (GREEN et al., 1989).

Por não apresentar um quadro clínico e histopatológico patognomônicos, o diagnóstico final de leucoplasia pilosa só pode ser fechado com a detecção de seu agente etiológico, o EBV (GREENSPAN et al., 1998; EC-CLEARINGHOUSE, 1993).

A detecção do vírus pode ser feita através de diversas técnicas como a PCR (*polimerase chain reaction*), hibridização *in situ*, imunohistoquímica, imunocitoquímica e microscopia eletrônica (SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1993; MABRUK et al., 1994; MABRUK et al., 1996; LANGFORD et al., 1992; WALLING et al., 2003). O padrão-ouro para o diagnóstico da leucoplasia pilosa é a técnica de hibridização *in situ* (GULLEY, 2001; LOUGHREY et al., 2004).

As características citopáticas da leucoplasia pilosa foram comparadas com a detecção do EBV por meio da hibridização *in situ* no diagnóstico da leucoplasia pilosa (GREENSPAN et al., 1998). Falsos negativos variaram entre 8% e 25%, e falsos positivos entre 8% e 25%. Células balonizantes e halo perinuclear foram encontrados em todos os casos confirmados por hibridização *in situ*, porém, essas alterações também foram encontradas em 75% dos casos que foram negativos para detecção do vírus. As alterações nucleares mais encontradas foram inclusões e homogeneização. Os autores concluíram que as características citoplasmáticas não podem ser utilizadas como parâmetros para o diagnóstico, e que, as alterações nucleares demonstraram-se um bom parâmetro, porém não completo, se comparado a hibridização. Considerando o potencial alto de falsos negativos e positivos, o quadro histopatológico da lesão não pode ser usado como substituto da reação de

hibridização *in situ* para o diagnóstico definitivo da leucoplasia pilosa (GREENSPAN et al., 1998).

O material para exame classicamente é oriundo de biópsias, porém alguns autores, na tentativa de desenvolvimento de técnicas diagnósticas menos invasivas, utilizaram a citologia esfoliativa como substituto da biópsia em alguns trabalhos (LANGFORD et al., 1992; MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993; AMMATUNA et al., 1998; SCULLY et al., 1998; AMMATUNA et al., 2001; WALLING et al., 2003; BRAZ-SILVA et al., 2005).

A citopatologia foi avaliada como substituta da histopatologia no diagnóstico da leucoplasia pilosa. Esfregaços da lesão foram corados pela técnica de Papanicolaou e demonstraram a presença de numerosos queratinócitos com condensação nuclear, característico da infecção por EBV, condição denominada “núcleo em colar” (nuclear beading). O exame citopatológico foi considerado como um método seguro, fácil, rápido, prático, não invasivo e barato (MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993; FRAGA-FERNÁNDEZ; VICANDI-PLAZA, 1992). A microscopia eletrônica também foi utilizada para análise citopatológica, tendo melhores resultados se comparados ao da microscopia de luz (EPSTEIN et al., 1995).

Assim como o quadro histopatológico, as características citopatológicas não são patognomônicas da lesão, sendo dessa forma necessária a detecção do EBV também nessa forma diagnóstica (LANGFORD et al., 1992).

A associação de técnicas de biologia molecular para identificação do EBV em material de exame citológico tem sido realizada (KOBAYASHI et al., 1998; MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993; LANGFORD et al., 1992; MABRUK et al.,

1994; AMMATUNA et al., 1998; SCULLY et al., 1998; AMMATUNA et al., 2001; WALLING et al., 2003; BRAZ-SILVA et al., 2005).

2.4 Tratamento

Normalmente a leucoplasia pilosa não requer tratamento específico, pois geralmente a lesão não causa sintomatologia, porém questões estéticas podem levar o paciente desejar a solução do caso clínico (GREENSPAN et al., 1990). Outro fator que justificaria o tratamento da leucoplasia pilosa seria o fato do intercâmbio de partículas virais da lesão com linfócitos B periféricos. Nesse caso, a lesão funcionaria como um reservatório de EBV, que posteriormente poderiam infectar células B circulantes (GREEN et al., 2002; PALEFSKY et al., 2002; LAGENAUR, 1999).

O tratamento sistêmico da leucoplasia pilosa consiste no uso de antiretrovirais, que interrompem o ciclo replicativo do EBV. As drogas mais utilizadas são: aciclovir (800mg 5x ao dia); desciclovir (250mg 3 x ao dia); famciclovir (500mg 3 x ao dia) e valaciclovir (1000mg 3 x ao dia) (BARR, 1995; WALLING et al., 2003). O período de resolução da lesão varia em torno de 1 a 2 semanas, podendo haver uma recidiva de 1 a 4 meses após a descontinuação do tratamento (GREENSPAN et al., 1990; WALLING et al., 2003).

Em determinadas fases da AIDS, em que o paciente faz uso de antivirais, o tratamento da leucoplasia pilosa seria desnecessário, pois o esquema terapêutico empregado suficiente para a redução da lesão (FICARRA et al., 1992).

Alguns autores salientam a inconveniência do uso da medicação sistêmica para o tratamento da leucoplasia pilosa, pois seus efeitos secundários não são desejáveis, podendo haver desenvolvimento de resistência viral ao medicamento. Em resposta a esses problemas, os autores indicam o uso de medicamentos tópicos, como a solução alcoólica de podofilina ou o ácido retinóico (TRANTOS et al., 1997).

A podofilina é um agente quimioterápico que interfere na replicação celular. A solução alcoólica de podofilina a 25% tem sido utilizada no tratamento tópico da leucoplasia pilosa com relativo sucesso (LOZADA-NUR; COSTA, 1992; SANCHEZ; SPIELMAN; EPSTEIN, 1992). O medicamento possui um gosto bastante amargo e desagradável, retornando o paladar ao normal aproximadamente uma hora após a aplicação. Alguns pacientes podem relatar discreta indisposição gástrica (LOZADA-NUR; COSTA, 1992). A podofilina tem efeitos celulares tóxicos, porém seu mecanismo de ação terapêutico na leucoplasia pilosa é desconhecido. Descontinuado o tratamento, costuma-se recidivar a lesão após algumas semanas (LOZADA-NUR; COSTA, 1992).

O uso tópico de ácido retinóico (tretinoína) tem sido preconizado por alguns autores. Esse ácido age inibindo a replicação viral *in vitro* e induz a diferenciação celular, havendo um estímulo da descamação epitelial (LOZADA-NUR; COSTA, 1992). O ácido retinóico é um desqueratinizador que tem sido utilizado para modular a presença de células de Langerhans no líquen plano oral, levando a crer que sua atuação na leucoplasia pilosa seja a mesma. Interrompido o tratamento, as lesões tendem a recidivar após alguns dias (GOWDEY; LEE; CARPENTER, 1995).

Comparando os dois medicamentos de uso tópico para o tratamento da leucoplasia pilosa, pode-se observar o custo menos elevado da podofilina, sua

simplicidade de aplicação e seu efeito mais prolongado (GOWDEY; LEE; CARPENTER, 1995).

O esquema terapêutico da podofilina consiste na aplicação de solução alcoólica a 25% com cotonete na lesão, de 2 a 3 vezes ao dia, fazendo um bochecho com água durante 30 a 60 segundos após a aplicação. O tratamento geralmente tem duração de uma semana (BARR, 1993).

Utiliza-se o ácido retinóico em solução tópica a 0,05%, aplicando na área afetada por um a dois minutos, diariamente, durante vários dias (BARR, 1993).

A excisão cirúrgica conservadora também pode ser considerada uma alternativa terapêutica para pequenas lesões de leucoplasia pilosa. A crioterapia foi utilizada por alguns autores (HERBST et al., 1989).

Os medicamentos antirretrovirais também podem produzir regressão da leucoplasia pilosa. A combinação de terapias no tratamento de pacientes com infecção avançada pelo HIV, suprime a carga viral a níveis abaixo do detectado e eleva a contagem de linfócitos TCD4+. Conseqüentemente, o sistema imunológico do paciente com HIV/AIDS melhora de forma significativa e observa-se normalmente a regressão total da Leucoplasia pilosa e de outras manifestações bucais relacionadas a imunossupressão (BROCKHEIMER et al., 1989).

3 PROPOSIÇÃO

- 1) Verificar a presença do EBV em lesões diagnosticadas clínica e ou histopatologicamente como sugestivas de leucoplasia pilosa no Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.
- 2) Verificar a correlação das características histopatológicas da leucoplasia pilosa com a identificação do EBV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, através do parecer nº 104/05 (Anexo A).

Foram utilizados 36 espécimes emblocados em parafina do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da FOUSP, que receberam laudo histopatológico de “quadro sugestivo de leucoplasia pilosa” ou de “leucoplasia pilosa”.

Os dados relativos às lesões como sexo, raça, idade, localização anatômica e status sorológico para o HIV foram obtidos através da consulta das fichas de pedido de exame anátomo-patológico (Anexo B) e compilados para futura análise.

4.1 Reação de hibridização *in situ*

Os espécimes foram cortados na espessura de 5 µm e montados em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical Co., MO, USA) 10% em etanol 100% e secas em estufa a 37°C por 24 horas.

Os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol (30 min.- 59°C, 20 min.- 25°C). Em seguida, os cortes foram hidratados em cadeia decrescente de etanol (absoluto I, II, III, 95% e 85%) e após imersos por 10 minutos

em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol 95% para remoção do pigmento formólico. Os preparados foram então lavados em água corrente por 10 minutos, e sofreram duas passagens em água destilada.

Toda a reação para a detecção do EBV (com exceção das sondas) foi realizada com o PNA ISH Detection Kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), que continha lâminas controle, positivas e negativas a serem realizadas junto com cada bateria de lâminas. Como casos controle positivos da reação, foram utilizados espécimes de linfoma sabidamente positivos para o EBV, gentilmente cedidos pela Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

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

Após o pré-tratamento dos cortes com a proteinase K, iniciou-se a reação de hibridização propriamente dita. Colocou-se em cada corte duas gotas da sonda conjugada à fluoresceína EBER (Y5200) (DakoCytomation Inc., CA, USA), sendo estes cobertos por uma lâminula. Os cortes dentro da câmara úmida foram levados para incubação em estufa a 55°C pelo período de 1 hora e 30 minutos.

Retirada as lamínulas, os cortes foram imersos em solução de estringência pré – aquecida (Stringent Wash 50x concentrado, DAKO, S3500), na proporção de 1:60 em água destilada, e colocados em estufa a 55° por 25 minutos. As lâminas

foram então passadas por uma solução de TRIS (Tris-hidroximetilainoetano) (10mM TRIS e NaCl, pH=7,6).

Recolocou-se as lâminas em câmara úmida e em cada corte, adicionou-se de duas a três gotas do anticorpo (Anti-FITC/AP) incubando pelo período de 30 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo foi removido com lavagem em TBS (Tris-Buffered Saline, pH 7,5). As lâminas foram colocadas em TBS pelo período de 3 minutos por duas vezes e logo após passadas por duas vezes em água destilada por 1 minuto.

Em câmara úmida, adicionou-se em cada corte de 2 a 3 gotas de substrato (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) e nitroblue tetrazolium (NBT)) que foram incubados por 45 minutos em temperatura ambiente. O substrato foi removido com água destilada e as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos.

Os cortes foram contracorados com Fast-Red (DakoCytomation Inc., CA, USA) por 1 minuto em temperatura ambiente, lavados em água corrente por 5 minutos e passados em água destilada. Em seguida foi realizada a desidratação dessas secções histológicas (etanol ascendente 80%, 90%, absoluto I, II, III), que foram recobertas com lamínulas de vidro, utilizando meio de montagem Permount (Fisher Scientific, NJ, USA). A marcação positiva foi evidenciada ao microscópio óptico com uma coloração azul escura ou preta no sítio da hibridização, ou seja, no núcleo.

Os espécimes corados foram observados ao microscópio de luz, aumento de até 400X, por um patologista bucal e pelo autor deste trabalho. Havendo marcação do núcleo de coloração azul escura ou preta, o caso foi considerado positivo para o EBV.

4.2 Características Histopatológicas

A avaliação do quadro histopatológico dos espécimes selecionados levaram em consideração os seguintes parâmetros:

1. hiperparaqueratose
2. acantose
3. células semelhantes à coilócitos (coilocitose)
4. presença de hifas de *Candida sp*
5. ausência ou discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente

Essas características foram levantadas através da leitura da descrição histopatológica da lesão, realizada pelo patologista responsável no momento do diagnóstico, presente nos laudos anátomo-patológicos arquivados no Serviço de Patologia Cirúrgica da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Vale ressaltar que não foi feita a revisão das lâminas coradas em H&E, pois o intuito do trabalho foi a avaliação do diagnóstico histopatológico já realizado, não havendo a interferência de outro patologista.

Após observarmos nas descrições dos laudos a presença ou ausência de cada aspecto histológico citado anteriormente, comparamos a frequência desses achados com o resultado da reação de hibridização *in situ* para marcação do EBV.

4.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o intuito de verificarmos a relevância da relação entre os achados histopatológicos descritos nos laudos com os resultados

da reação de hibridização in situ para o EBV, bem como a relação entre o sítio da lesão com o diagnóstico final da lesão, através do programa BioEstat 3.0.

5 RESULTADOS

Dos 36 espécimes submetidos à reação de hibridização *in situ* para a detecção do EBV, 27 foram positivos (75%). Aplicando-se teste estatístico binomial- duas proporções, pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre o exame histopatológico e a técnica de hibridização *in situ* para o diagnóstico ($p=0.0007$) (figura 5.1 e 5.2)

Do total de casos analisados, 23 (63,88%) eram de pacientes do sexo masculino e 13 (36,11%), do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi de 33 anos. Os dados relativos à soropositividade para o HIV compilados das fichas de solicitação de exame anátomo patológico estão resumidos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Informação sobre a soropositividade para o HIV

Soropositividade	Total de casos	EBV positivo	EBV negativo
HIV	(n=36)	(n=27)	(n=09)
HIV positivo	25 casos (69,44%)	18 casos (66,6%)	07 casos (77,8%)
HIV negativo	01 caso (2,8%)	01 caso (3,7%)	00 caso
Sem informação	10 casos (27,7%)	08 casos (29,6%)	02 casos (22,2%)

De acordo com o sítio anatômico mencionado na ficha, o de maior prevalência foi a borda lateral de língua, em 27 casos (75%), seguido de mucosa jugal, língua e região retromolar. A distribuição de acordo com a presença ou não do EBV dos casos analisados estão descritos na tabela 5.2. O teste exato de Fisher revelou que não houve relação estatisticamente significativa entre diagnósticos confirmados pela hibridização *in situ* em bordo lateral de língua com o das demais regiões ($p=0.525$).

Tabela 5.2 - Localização anatômica das lesões

Local da lesão	Total de casos (n=36)	EBV positivo (n=27)	EBV negativo (n=09)
Borda lateral de língua	27 casos (75%)	21 casos (77,7%)	06 casos (66,6%)
Mucosa jugal	05 casos (13,9%)	04 casos (14,8%)	01 casos (11,1%)
Língua	03 casos (8,3%)	01 casos (3,7%)	02 caso (22,2%)
Região retromolar	01 caso (2,9%)	01 caso (3,7%)	00 caso

Teste exato de Fisher ($p=0.525$)

Para a comparação das características histopatológicas descritas nos laudos com os resultados da reação de hibridização *in situ*, foram levadas em consideração as seguintes características: presença de hiperparaqueratose, acantose, presença de células semelhantes a coilócitos (coilocitose) e ausência ou discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente (figura 5.1 e 5.2). A presença de cada característica está relacionada com a marcação para o EBV, na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Características histopatológicas descritas

Características histopatológicas	Total de casos (n=36)	EBV positivo (n=27)	EBV negativo (n=09)
Hiperparaqueratose	36 casos (100%)	27 casos (100%)	09 casos (100%)
Acantose	30 casos (83,3%)	26 casos (96,3%)	04 casos (44,45%)
Coilocitose	27 casos (75%)	23 casos (85,2%)	04 casos (44,45%)
Hifas de <i>candida</i>	10 casos (27,8%)	09 casos (33,3%)	01 caso (11,1%)
Ausência ou discreto infiltrado inflamatório	27 casos (75%)	22 casos (81,5%)	05 casos (55,5%)

Teste de Comparação entre várias proporções (p=0.6837)

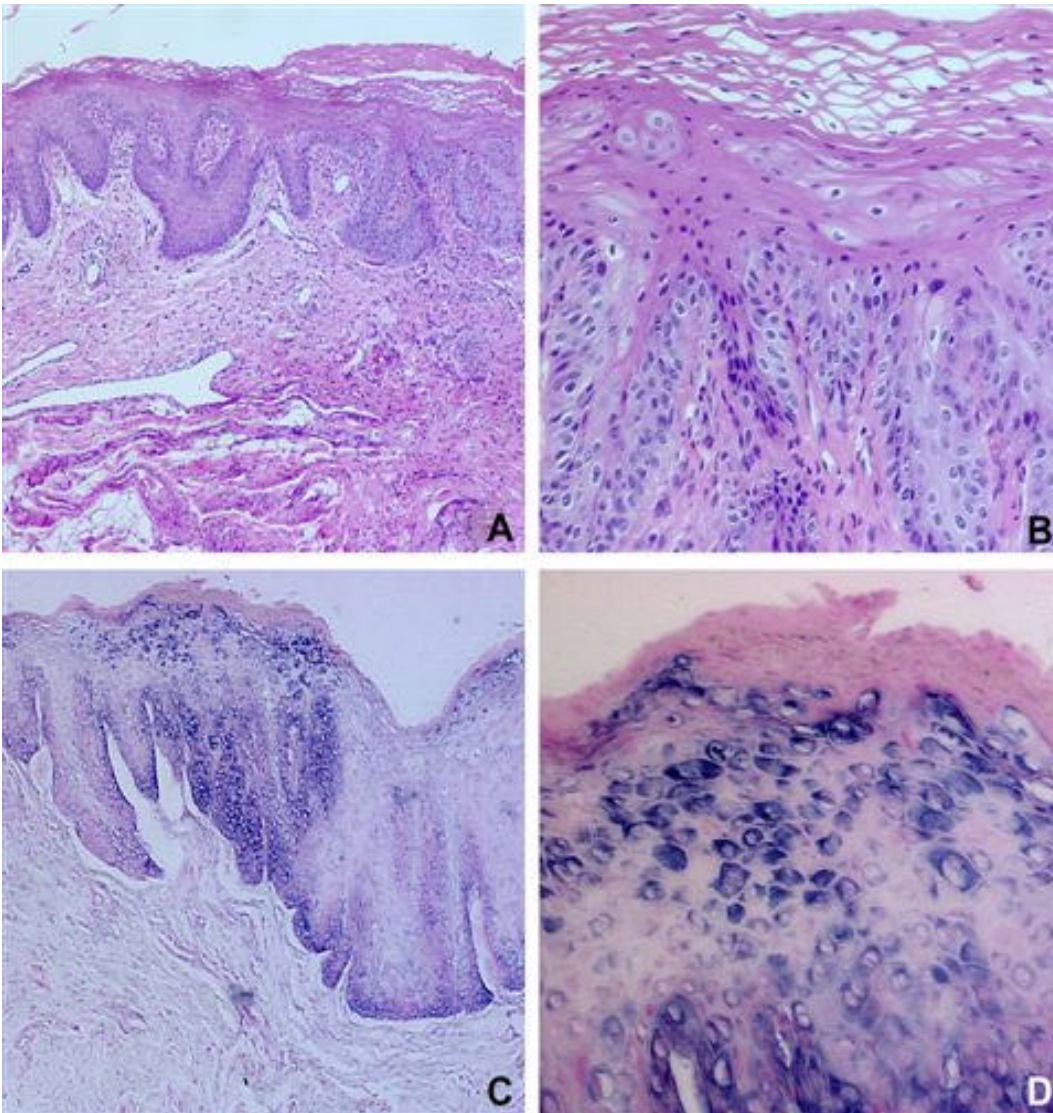


Figura 5.1 Características histopatológicas e hibridização *in situ* de leucoplasia pilosa: **A.** Quadro histopatológico exibindo acantose, hiperparaqueratose, células semelhantes a coilócitos e discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente (H&E / aumento 100 X); **B.** Algumas células semelhantes a coilócitos ou células balonzantes (H&E / aumento 400 X); **C** (100 X) e **D** (400 X). Reação de hibridização *in situ* demonstrando marcação positiva para o EBV

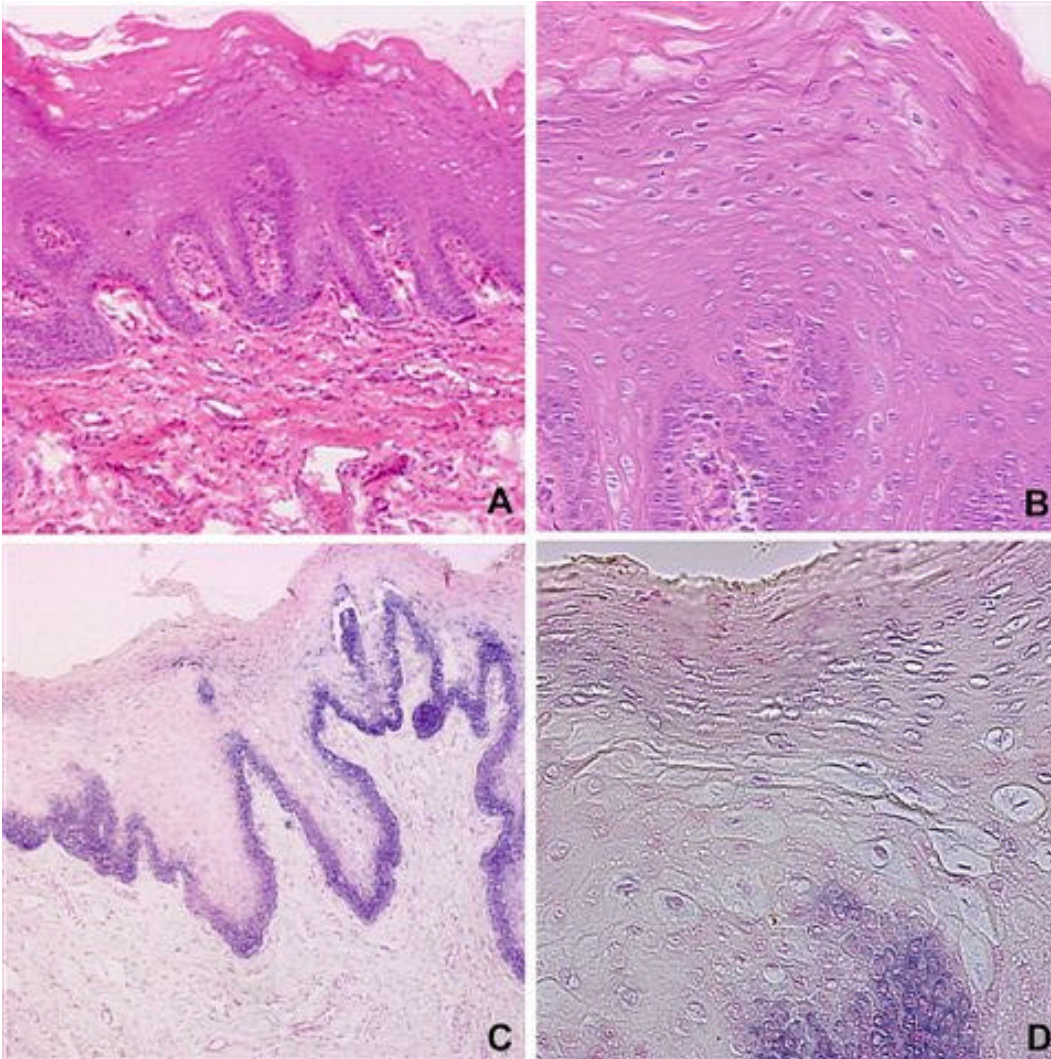


Figura 5.2 Características histopatológicas e hibridização *in situ* de lesão sugestiva de leucoplasia pilosa: **A.** Quadro histopatológico exibindo acantose, hiperparaqueratose, células semelhantes a coilócitos e discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente (H&E / aumento 100 X); **B.** Algumas células semelhantes a coilócitos ou células balonzantes (H&E / aumento 400 X); **C (100 X)** e **D (400 X).** Reação de hibridização *in situ* demonstrando marcação negativa para o EBV

6 DISCUSSÃO

A leucoplasia pilosa é uma lesão epitelial benigna da mucosa oral, associada ao ciclo replicativo do EBV, que ocorre principalmente em borda lateral de língua (WALLING et al., 2003; GREENSPAN et al., 1998; FARIA et al., 2005). A lesão foi inicialmente descrita como exclusivamente associada à infecção pelo HIV (GREENSPAN et al., 1985). Posteriormente, casos em pacientes HIV negativos imunossuprimidos por diversas razões foram observados, levando a acreditar que a lesão estava associada à imunossupressão de um modo geral (ITIN et al., 1988; GREENSPAN et al., 1989; MIRANDA; LOZADA-NUR, 1996; MACLEOD; LONG; SOAMES, 1990; SYRJÄNEN et al., 1989).

Os dados clínicos e demográficos desse estudo, como já descrito em materiais e métodos, foram coletados das informações contidas na ficha de solicitação de exame anátomo-patológico. Pelas informações colhidas, a maioria dos casos eram de pacientes HIV positivos (69,44%), e apenas 1 caso (2,8%) de paciente transplantado renal HIV negativo. Foi grande o número de casos (27,7%) em que não havia qualquer tipo de informação referente à condição de soropositividade ao HIV ou outro tipo de imunossupressão.

A leucoplasia pilosa afeta predominantemente o sexo masculino em idade adulta, sendo bastante rara em crianças e adolescentes (MAGALHÃES et al., 2000; PORTELA et al., 2002; FERGUSON et al., 1993; LASKARIS; LASKARIS; THEODORIDOU, 1995). Nossa casuística apresentou-se de maneira semelhante aos achados da literatura, com 23 casos (63,88%) afetando o sexo masculino e uma média de idade de 33 anos. Dos 36 casos analisados, apenas dois (2,8%) afetavam

adolescentes, demonstrando a raridade dessa lesão no grupo de pacientes pediátricos (LASKARIS; LASKARIS; THEODORIDOU, 1995). Outro fator interessante foi o aumento da participação de mulheres na casuística de leucoplasia pilosa, o que reflete o número crescente de mulheres infectadas pelo HIV principalmente no final da década de 80 (SHIBOSKI, 1997; MAGALHÃES, 2000).

O local de absoluta predileção da leucoplasia pilosa é a borda lateral de língua (FARIA et al., 2005; GREENSPAN et al., 1998; REICHART et al., 1989), sendo bastante rara sua localização em outras regiões da mucosa oral (REICHART et al., 1989). Nossos resultados também foram bastante semelhantes aos levantamentos da literatura, com 27 casos (75%) em borda lateral de língua. Dos casos levantados, três apresentavam como localização anatômica apenas a denominação língua anotada pelo cirurgião-dentista. Apesar de muito provavelmente a localização dessas lesões tenha sido em borda lateral de língua, as colocamos em categoria distinta para não realizar qualquer tipo de interferência nas informações colhidas. Para a análise estatística, agrupamos as lesões em dois grupos, borda lateral de língua com 27 casos e outros sítios anatômicos, que compreenderam os casos de mucosa jugal (5 casos), língua (3 casos) e região retromolar (1 caso) totalizando 9 casos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diagnósticos confirmados pela hibridização *in situ* em borda lateral de língua e das outras regiões. Essa análise foi realizada pois levantamos a hipótese de que, tendo a informação do sítio anatômico de maior prevalência da leucoplasia pilosa, sugestionaria o patologista, frente ao quadro histopatológico compatível com a lesão, a dar o seu diagnóstico positivo. Isso nos atenta ao fato da necessidade de esclarecimento dos clínicos no preenchimento das fichas de solicitação de exame histopatológico, da importância e relevância de dados clínicos do paciente nem tanto

para a construção do diagnóstico pelo patologista, neste caso em particular, mas sim para estudos retrospectivos como este que estamos realizando.

O diagnóstico da leucoplasia pilosa é um fator bastante controverso na literatura, com correntes de autores que acreditam no diagnóstico firmado em bases clínicas somente, outros em bases clínicas e histopatológicas ou citopatológicas e ainda os que requerem a detecção do seu agente etiológico, o EBV, por meio de técnicas de biologia molecular (GREENSPAN et al, 1998).

O aspecto clínico da leucoplasia pilosa é característico, porém não patognomônico (GREENSPAN; GREENSPAN, 1992). Descrita como uma placa branca, de superfície irregular, corrugada ou pilosa, com projeções proeminentes, semelhantes a pêlos, principalmente em borda lateral de língua, uni ou bilateral, não removida quando raspada, de limites imprecisos, variando de tamanho de poucos milímetros até vários centímetros, podendo recobrir toda a região (GREENSPAN et al., 1984). Seu diagnóstico diferencial se faz com hiperparaqueratose, candidíase hiperplásica, líquen plano, nevo branco esponjoso, leucoplasia idiopática ou associada ao tabaco e glossite migratória (MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993; SCHULTEN et al., 1991; TRIANTOS et al., 1997).

As características clínicas das lesões não puderam ser levadas em consideração nesse trabalho, pois em nenhum dos casos levantados no arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, havia qualquer tipo de informação referente aos aspectos clínicos da lesão.

O quadro histopatológico da leucoplasia pilosa caracteriza-se por hiperplasia epitelial decorrente de projeções de queratina, hiperparaqueratose, acantose e presença de células balonizantes encontradas na porção média ou superficial da camada espinhosa, semelhantes a coilócitos (coilocitose) e ausência ou escasso

infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente (GREENSPAN; GREENSPAN, 1989; SOUTHAM et al., 1991; GREENSPAN et al., 1998; GREEN et al., 1989; SHIODT et al., 1987; WALLING et al., 2003; FARIA et al., 2005).

Estudos foram realizados na tentativa de estabelecer padrões histopatológicos para o diagnóstico da leucoplasia pilosa, buscando as características mais prevalentes na lesão e as comparando com a detecção do EBV por meio da hibridização *in situ* (SOUTHAM et al., 1991; GREENSPAN et al., 1998). As características histopatológicas mais marcantes da leucoplasia pilosa são hiperparaqueratose, acantose, células semelhantes à coilócitos (coilocitose), presença de hifas de *Candida sp* e ausência ou discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente (SCHIODT et al., 1987; FRAGA-FERNÁNDEZ; BENITO; LIZALDEZ, 1990).

Nossos resultados foram bastante semelhantes aos encontrados em literatura. Com a análise dos casos selecionados, obtivemos a confirmação do diagnóstico através da detecção do EBV pela hibridização *in situ* em 27 dos 36 casos (75%). A diferença entre os casos confirmados e não confirmados foi estatisticamente significativa ($p=0.0007$), mostrando a extrema importância da detecção do vírus para o diagnóstico final da lesão, concordando com outros trabalhos já descritos (SCHMIDT-WESTHAUSEN et al., 1993; MABRUK et al., 1994; MABRUK et al., 1996; LANGFORD et al., 1992; WALLING et al., 2003).

As características histopatológicas mais presentes nas lesões foram semelhantes as encontradas em outros levantamentos (SOUTHAM et al., 1991; GREENSPAN et al., 1998, REICHART et al., 1989), com exceção feita à presença de hifas de *Candida*, em que nossos achados (27,8%) ficaram abaixo da média encontrada em literatura, que gira em torno de 50% dos casos (REICHART et al.,

1989). Esse fato pode ser explicado por dois motivos; primeiro, os pacientes poderiam estar sob terapia antifúngica, informação essa que não tivemos acesso e segundo, após a introdução da HAART houve uma considerável diminuição nos casos de candidíase, tanto pela ação direta dos inibidores de protease no fungo, quanto na melhora da resposta do sistema imunológico do hospedeiro (GREENSPAN et al., 2001; EYESON et al., 2002; TAPPUNI; FLEMING, 2001; NICOLATOU-GALITIS et al., 2004; GREENSPAN et al., 2004; CHATTOPADHYAY et al., 2005, MARCUS et al., 2005).

Nenhuma das características histopatológicas consideradas no estudo pode correlacionar-se com a detecção do EBV, o que impossibilita a utilização de padrões histopatológicos como substituto da detecção do EBV no diagnóstico definitivo da leucoplasia pilosa.

Alguns autores propõem como alternativa à biópsia ao diagnóstico da leucoplasia pilosa o uso da citologia esfoliativa e a coloração de Papanicoulau (MIGLIORATI; JONES; BAUGHMAN, 1993; FRAGA-FERNÁNDEZ; VICANDI-PLAZA, 1992). Somente a observação citopatológica não é capaz de definir o diagnóstico da lesão, pois as características citopatológicas, assim como as histopatológicas, não são patognomônicas. A validação da citopatologia como técnica diagnóstica só é conseguida através da detecção do vírus através de técnicas de biologia molecular (WALLING et al., 2003; BRAZ-SILVA et al., 2005).

O diagnóstico das lesões bucais relacionadas à infecção pelo HIV tornou-se de extrema importância para o acompanhamento e estadiamento da infecção do paciente soropositivo, e especial ênfase tem sido dada ao diagnóstico da leucoplasia pilosa, por ser considerada marcador da progressão para a AIDS (CHATTOPADHYAY et al., 2005).

Com o advento da HAART a partir de 1996, houve uma acentuada diminuição e atenuação nas lesões oportunistas da cavidade oral (EYESON et al., 2002, TAPPUNI; FLEMING, 2001; MARCUS et al., 2005). A leucoplasia pilosa tem sido associada com contagem de linfócitos TCD4+ abaixo de 200 células/mm³ de sangue e carga viral acima de 20.000 cópias/ml de sangue, independente da contagem de células TCD4+ (CHATTOPADHYAY et al., 2005), demonstrando com sua presença o estado agravado de imunossupressão do paciente, que pode significar falha do esquema terapêutico por ineficiência da droga ou por não adesão do paciente ao esquema terapêutico.

Pacientes pediátricos, que apresentem o diagnóstico confirmado de leucoplasia pilosa, independente da contagem de linfócitos TCD4+, devem ser incluídos nos protocolos de terapia HAART (RAMOS-GOMEZ et al., 1999).

Diante da importância do diagnóstico correto da leucoplasia pilosa, e da implicância desse no acompanhamento clínico do paciente, podemos afirmar que o uso de técnicas complementares que nos possibilitem a confirmação do diagnóstico é de extrema importância para o adequado manejo terapêutico do paciente. Um diagnóstico correto da lesão pode evitar complicações mais sérias devido ao estado de imunossupressão do paciente.

O diagnóstico firmado apenas em bases histopatológicas, que muitas vezes é realizado de forma apenas descritiva para corroborar a hipótese clínica firmada, não acrescenta muito ao clínico, que deverá por vezes tomar a decisão de encaminhamento terapêutico do paciente somente com as informações semiológicas. A técnica de hibridização *in situ* permite ao patologista fazer o diagnóstico definitivo da lesão, dando mais segurança ao clínico frente as atitudes a serem tomadas no caso.

Técnicas não invasivas para a confirmação do diagnóstico da leucoplasia pilosa, associando técnicas de biologia molecular e citopatologia tem sido bastante exploradas atualmente (KOBAYASHI et al., 1998; MIGLIORATI; JONES; BAAUGHMAN, 1993; LANGFORD et al., 1992; MABRUK et al., 1994; AMMATUNA et al., 1998; SCULLY et al., 1998; AMMATUNA et al., 2001; WALLING et al., 2003; BRAZ-SILVA et al., 2005).

A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada em inúmeros trabalhos para identificação do EBV em raspados da mucosa oral (MABRUK et al., 1994; AMMATUNA et al., 1998; SCULLY et al., 1998; AMMATUNA et al., 2001; WALLING et al., 2003; BRAZ-SILVA et al., 2005). Esses trabalhos puderam mostrar a maior prevalência do EBV em pacientes imunossuprimidos HIV positivos (SCULLY et al., 1998) e transplantados renais (AMMATUNA et al., 1998; AMMATUNA et al., 2001; BRAZ-SILVA et al., 2005).

Como diagnóstico definitivo para leucoplasia pilosa, o método é contestado por alguns autores (MABRUK et al., 1994; SCULLY et al., 1998; BRAZ-SILVA et al., 2005), pois técnicas in vitro, como o caso da PCR, não conseguem distinguir partículas virais presentes na saliva ou no interior das células epiteliais descamadas na realização do exame, sendo desta forma inválido como diagnóstico (MABRUK et al., 1994).

O vírus Epstein-Barr é encontrado freqüentemente na saliva humana (IKUTA; HOSHIKAWA; SAIRENJI, 2000; IDESAWA et al., 2004). Na tentativa de eliminar a contaminação do EBV presente na saliva na realização do exame citológico, Ammatuna et al propuseram a realização de um bochecho com uma substância salina, PBS (phosphate buffered saline), prévio ao raspado da mucosa oral, como um descontaminante superficial da mucosa, afastando assim a possibilidade de

contaminação por partículas virais presentes na saliva (AMMATUNA et al., 1998; AMMATUNA et al., 2001).

Trabalho recentemente publicado, utilizando citologia esfoliativa em sua metodologia, comparou os resultados de raspados em borda lateral de língua de pacientes transplantados renais antes e depois do bochecho com o PBS, não encontrando qualquer diferença na detecção do EBV através do uso da PCR nos dois momentos analisados, demonstrando assim a ineficiência do bochecho na descontaminação da mucosa oral de partículas virais oriundas da saliva (BRAZ-SILVA et al., 2005).

Devido aos problemas encontrados na associação de técnicas diagnósticas *in vitro*, como a PCR, ao material de raspados de mucosa, tem-se tentado o desenvolvimento de técnicas *in situ* para utilização em conjunto com a citologia esfoliativa, através dos métodos de imunocitoquímica e hibridização *in situ*, na tentativa de validar a citopatologia como técnica diagnóstica da leucoplasia pilosa e outras infecções virais (LANGFORD et al., 1992; KOBAYASHI et al., 1998; WALLING et al., 2003).

O desenvolvimento das técnicas da PCR quantitativa em tempo real (real time PCR), tem permitido o monitoramento da carga viral do EBV, em amostras de saliva ou sangue, de pacientes com risco de desenvolvimento de doenças linfoproliferativas associadas ao EBV (GULLEY et al., 2001; NIESTERS et al., 2000; PATEL; ZUCKERMAN; SMITH, 2003; STEVENS et al., 2002; JABS et al., 2001; NIESTERS, 2004; FRIAS et al., 2001).

Neste sentido estamos nos dedicando ao desenvolvimento de técnica menos invasivas como a citologia esfoliativa, para coleta de material, sem contudo descartarmos a identificação do EBV dentro da célula. Uma vez que este trabalho

nos demonstrou a grande importância da detecção do vírus para a confirmação do diagnóstico de leucoplasia pilosa.

7 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo permitiram concluir que:

Uma vez que lesões diagnosticadas clínica e histopatologicamente como sugestivas de leucoplasia pilosa não mostraram marcação positiva para o EBV, e que, não se notou correlação entre as características histológicas da lesão e a presença do EBV, o diagnóstico da leucoplasia pilosa deve ser firmado em bases histopatológicas e moleculares, sendo a detecção do EBV por meio da hibridização *in situ* imprescindível para o diagnóstico final.

REFERÊNCIAS¹

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

Ammatuna P, Capone F, Giambelluca D, Pizzo I, D'Alia G, Margiotta V. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA and antigens in oral mucosa of renal transplant patients without clinical evidence of oral hairy leukoplakia (OHL). *J Oral Pathol Med* 1998; 27:420-7.

Arendorf TM, Bredekamp B, Cloete CAC, Sauer G. Oral manifestations of HIV infection in South African patients. *J Oral Pathol Med* 1998;27(3):176-179.

Barr C. Current therapy for common oral diseases associated with AIDS/HIV. In: Greenspan JS, Greenspan D, eds. *Oral manifestations of HIV infection: proceedings of the 2nd international workshop on the oral manifestations of HIV infection*, Jan 31-Feb 3, 1993. Carol Stream, ILL: Quintessence publishing, 1995:362-5.

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

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

Belton CM, Eversole LR. Oral hairy leukoplakia: ultrastructural features. *J Oral Pathol* 1986;15:493-9.

Braz-Silva PH, Ortega KL, Rezende NP, Nunes FD, Magalhães MHCG. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in the oral mucosa of renal transplant patients. *Diagn Cytopathol*. No prelo 2005, 31(5).

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

Brockmeyer NH, Kreuzfelder E, Mertins L, Daecke C, Goos M. Zidovudine therapy of asymptomatic HIV1-infected patients and combined zidovudine-acyclovir therapy of HIV1-infected patients with oral hairy leukoplakia. *J Invest Dermatol* 1989;92(4):647.

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

Centers for Disease Control and Prevention. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1993;41:1-19.

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

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

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

Cruz I, Van den Brule AJC, Steenberg RDM, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinomas, premalignant lesions and normal mucosa-a study using the polymerase chain reaction. *Oral Oncol* 1997;33(1):182-8.

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

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

De Souza Y, Greenspan D, Hammer M. Demonstration of Epstein-Barr virus DNA in the epithelial cells of hairy leukoplakia. *J Dent Res* 1986;65:765.

Diaz-Mitoma F, Ruiz A, Flowerdew G, Houston S, Romanowsky 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-Clearinghouse 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 JB, Fatahzadeh M, Maticic J, Anderson G. Exfoliative cytology and electron microscopy in the diagnosis of hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:564-9.

Epstein JB, Sherlock CH, Greenspan JS. Hairy leukoplakia-like lesions following bone marrow transplantation. *AIDS* 1991;5:101-2.

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

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.

Eversole LR, Stone CE, Beckman AM. Detection of EBV and HPV in oral hairy leukoplakia by in situ hybridization. *J Med Virol* 1988;26:271-7.

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

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

Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* 1990;345(31):447-9.

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

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

Ferguson FS, Archard H, Nuovo GJ, Nachman S. Hairy leukoplakia in a child with AIDS—a rare symptom: case report. *Pediatr Dent* 1993;15(4):280-1.

Ficarra G, Barone R, Gaglioti D. Oral hairy leukoplakia among HIV-positive intravenous drug abusers: a clinicopathologic and ultrastructural study. *Oral Surg* 1988;65:421-6.

Ficarra G, Romagnoli P, Piluso S, Milo D, Adler-Storhz K. Hairy leukoplakia with involvement of the buccal mucosa. *J Am Acad Dermatol* 1992;27(5):855-8.

Fowler CB, Reed KD, Brannon RB. Intranuclear inclusions correlate with the ultrastructural detection of Herpes type virions in oral hairy leukoplakia. *Am J Surg Pathol* 1989;13(12):114-9.

Fraga-Fernández J, Benito C, Lizalde EB. Oral hairy leukoplakia: a histopathologic study of 32 cases. *Am J Dermatol* 1990;12(6):571-8.

Fraga-Fernández J, Vicandi-Plaza B. Diagnosis of hairy leukoplakia by exfoliative cytologic methods. *Am J Clin Pathol* 1992;97(2):262-6.

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

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

Gowdey G, Lee MRK, Carpenter WM. Treatment of HIV-related hairy leukoplakia with podophyllum resin 25% solution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79(1):64-7.

Green DS, Edwards RH, Webster-Cyriaque J, Raab-Traub 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.

Green TL, Greenspan JS, Greenspan D, De Souza YG. Oral lesions mimicking hairy leukoplakia: a diagnostic dilemma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;67:422-6.

Greenspan D, Canchola AJ, MacPhail LA, Cheikh B, Greenspan JS. Effect of highly active antiretroviral therapy on frequency of oral warts. *Lancet* 2001;357:1411-2.

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

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(2):145-50.

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

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

Greenspan D, Greenspan JS. Significance of oral hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:151-4.

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;4:95-9.

Greenspan JS, Greenspan D, De Souza Y, Freese U. Diagnosis and investigation of hairy leukoplakia using non invasive techniques. *J Dent Res* 1987;66:184.

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.

Greenspan JS, Greenspan D. Oral hairy leukoplakia: diagnosis and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;67:396-403.

Greenspan JS, Rabanus JP, Petersen V, Greenspan D. Fine structure of EBV-infected keratinocytes in oral hairy leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 1989;18:565-72.

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

Herbest JS, Morgan J, Raab-Traub N, Resnick L. Comparison of the efficacy of surgery and acyclovir therapy in oral hairy leukoplakia. *J Am Acad Dermatol* 1989;21:753-6.

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

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

Husak R, Garbe C, Orfanos CE. Oral hairy leukoplakia in 71 HIV-seropositive patients: clinical symptoms, relation to immunologic status, and prognostic significance. *J Am Acad Dermatol* 1996;35(6):928-34.

Iamaroon A, Pongsiriwet S, Mahanupab P, Kitikamthon R, Pintong J. Oral non-Hodgkin lymphomas: studies of EBV and p53 expression. *Oral Dis* 2003; 9:14-8.

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

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

Itin P, Ruffli T, Rudlinger R, Cathomas G, Huser B, Podvinec M, et al. Oral hairy leukoplakia in an HIV-negative renal transplant patient: a marker for immunosuppression? *Dermatol* 1988;177:126-8.

Jabs WJ, Hennig H, Kittel M, Pethig K, Smets F, Bucsky P, et al. Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):564-9.

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.

Kobayashi I, Shima K, Saito I, Kiyoshima T, Matsuo K, Ozeki S, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1999, 189:34-9.

Kobayashi TK, Ueda M, Nishino T, Terasaki S, Kameyama. Brush cytology of Herpes simplex virus infection in oral mucosa: use of the ThinPrep® processor. *Diagn Cytopathol* 1998;18:71-5.

Lagenaur LA, Palefsky JM. Regulation of Epstein-Barr virus promoters in oral epithelial cells and lymphocytes. *J Virol* 1999;73(8):6566-72.

Langford A, Kunze R, Schmelzer S, Wolf H, Pohle HD, Reichart P. Immunocytochemical detection of herpes viruses in oral smears of HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 1992;21(2):47-9.

Laskaris G, Laskaris M, Theodoridou M. Oral hairy leukoplakia in a child with AIDS. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:570-1.

Li QX, Young LS, Niedobitek G, Dawson CW, Birkenbach M, Wang F, Rickinson AB. Epstein-Barr virus infection and replication in a human epithelial cell system. *Nature* 1992;356:347-50.

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

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

Lozada-Nur F, Costa C. Retrospective findings of the clinical benefits of podophyllum resin 25% sol on hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(5):555-8.

Mabruk MJEMF, Flint SR, Coleman DC, Sheils O, Toner M, Atkins GJ. A rapid microwave-*in situ* hybridization method for the definitive diagnosis of oral hairy leukoplakia: comparison with immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med* 1996;25:170-6.

Mabruk MJEMF, Flint SR, Toner M, Balluz I, Coleman D, Sullivan D, et al. 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 Pathol Med* 1994;23:302-8.

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

Magalhães MHCG, Bueno DF, Serra E, Gonçalves R. Oral manifestations of HIV positive children. *J Clin Pediatr Dent* 2000;25(2):103-6.

Magalhães MHCG. Estudo retrospectivo das alterações bucais em mulheres HIV positivas [Tese de Livre Docência] São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2000.

Marcus M, Maida CA, Freed JR, Younai F, Coulter ID, Der-Martirosian C, et al. Oral white patches in a national sample of medical HIV patients in the era of HAART. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:99-106.

Margiotta V, Campisi G, Mancuso S, Accurso V, Abbadessa V. HIV infection: oral lesions, CD4+ cell count and viral load in an Italian study population. *J Oral Pathol Med* 1999;28(4):173-4.

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

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

McCullough MJ, Firth NA, Reade PC. Human immunodeficiency virus infection: a review of the mode of infection, pathogenesis, disease course, and the general and clinical manifestations. *Aust Dent J* 1997;42(1):30-7.

Melnick SL, Hannan P, Decher L. Increasing CD8+ lymphocytes predict subsequent development of intraoral lesions among individuals in virus. *J Acq Imm Def Sundr* 1991;4(12):1199-1207.

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 DR, Heard PL, Cagle MP, DiMaio D, Ench Y, Morrison DG, et al. Absence of a reservoir of Epstein-Barr virus (EBV) in normal tongue epithelium. *J Oral Pathol Med* 1994;23:156-160.

Miller G. The Switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 1990;161:833-44.

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

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

Nicolatou-Galitis O, Velegraki A, Paikos S, Economopoulou P, Stefaniotis T, Papanikolaou IS, et al. Effect of P-HAART on the prevalence of oral lesions in HIV -1 infected patients. A Greek study. *Oral Dis* 2004;10:145-50.

Niesters HGM, van Esser J, Fries E, Wolthers KC, Cornelissen J, Osterhaus ADME. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol* 2000;38:712-5.

Niesters HGM. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:5-11.

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

Patel S, Zuckerman M, Smith M. Real-time quantitative PCR of Epstein-Barr virus BZLF1 DNA using the LightCycler. *J Virol Method* 2003;109:227-33.

Patton LL, Mckaig RG, Strauss RP, Eron Jr. JJ. Oral manifestations of HIV in a southeast USA population. *Oral Dis* 1998;4(3):164-9.

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

Pesce KB, Morand P, Schmuck A, Bourgeat MJ, Buisson M, Barguès G, et al. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J Med Virol* 2002;66:360-9.

Portela MB, Castro GF, Costa EM, Silva Jr A, Dias EP, Souza IPR. Case report on a rare lesion in an HIV -infected child: hairy leukoplakia. *J Clin Pediatr Dent* 2002;26(4):405-8.

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

Rabanus JP, Greenspan D, Petersen V, Leser U, Wolf H, Greenspan JS. Subcellular distribution and lif cycle of Epstein-Barr virus in keratinocytes of oral hairy leukoplakia. *Am J Pathol* 1991;139(1):185-97.

Ramos-Gomez FJ, Flaitz C, Catapano P, Murray P, Milnes AR, Dorenbaum A. Classification, diagnostic criteria, and treatment recomendations for orofacial manifestations in HIV -infected pediatric patients. *J Clin Pediatr Dent* 1999;23(2):85-96.

Ramirez-Amador VA, Esquivel-Pedraza L, De Leon SP. Prognostic value of oral candidosis and hairy leukoplakia in 111 Mexican HIV -infected patients. *J Oral Pathol Med* 1996;25(5):206-11.

Ravina A, Ficarra G, Chiodo M, Mazzeti M, Romagnani S. Relationship of circulating CD4+ T-lymphocytes and p24 antigenemia to the risk of developing AIDS in HIV -infected subjects with oral hairy leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 1996;25(3):108-11.

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;18:410-5.

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

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

Ryon JJ, Hayward SD, MacMahon EME, Mann RB, Ling Y, Charache P, et al. In situ detection of lytic Epstein-Barr infection: expression of the *Notf* early gene and viral interleukin-10 late gene in clinical specimens. *J Infect Dis* 1993;168:345-51.

Sanchez M, Spielman T, Epstein W. Treatment of oral hairy leukoplakia with podophylin. *Arch Dermatol* 1992;128(12):1659.

Sand L, Wallström, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Epstein-Barr virus and human papillomavirus in snuff-induced lesions of the oral mucosa. *Acta Otolaryngol* 2000;120:880-4.

Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:586-92.

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. *Histopathol* 1992;20:387-95.

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

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

Schulten EAJM, Snijders PJF, Kate RWT, Mullink H, Walboomers JMM, Meijer CJL, et al. Oral hairy leukoplakia in HIV infection: a diagnostic pitfall. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71(1):32-7.

Sciubba J, Brandsma J, Schwartz M, Barrezueta N. Hairy leukoplakia: an AIDS-associated opportunistic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;26(7):297-304.

Scully C, Porter SR, Di Alberti L, Jalal M, Maitland N. Detection of Epstein-Barr virus in oral scrapes in HIV infection, in hairy leukoplakia, and in healthy non-HIV-infected people. *J Oral Pathol Med* 1998;27:480-2.

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

Shiboski CH. Epidemiology of HIV-related oral manifestations in women: a review. *Oral Dis* 1997;3(Suppl 1):18-27.

Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Human Pathol* 2002; 33(6):608-14.

Slots J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2005; 38: 33-62.

Southam JC, Felix DH, Wray D, Cubie HA. Hairy leukoplakia – a histological study. *Histopathol* 1991;19:63-7.

Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Annals Intern Med* 1993;118:45-58.

Stevens SJC, Verkuijlen SAWM, van der 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* 2002;40(11):3986-92.

Syrjänen S, Laine P, Happonen RP, Niemelä M. Oral hairy leukoplakia is not a specific sign of HIV-infection but related to immunosuppression in general. *J Oral Pathol Med* 1989;18:28-31.

Tappuni AR, Flemming GJP. The effect of antiretroviral therapy on the prevalence of oral manifestations in HIV-infected 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.

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

Tsang PCS, Samaranayake LP. Oral manifestation of HIV infection in a group of predominantly ethnic chinese. *J Oral Pathol Med* 1999;28(3):122-7.

Walling DM, Brown AL, Etienne W, Keitel WA, Ling PD. Multiple Epstein-Barr virus infections in healthy individuals. *J Virol* 2003;77(11):6546-50.

Walling DM, Flaitz CM, Adler-Storhiz K, Nichols CM. A non-invasive technique for studying oral epithelial Epstein-Barr virus infection and disease. *Oral Oncology* 2003;13:436-44.

Walling DM, Flaitz CM, Nichols CM, Hudnall SD, Adler-Storhiz K. Persistent productive Epstein-Barr virus replication in normal epithelial cells in vivo. *J Infect Dis* 2001;184:1499-1507.

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

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

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

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

Webster-Cyriaque J, Middeldorp J, Raab-Traub N. Hairy leukoplakia: an unusual combination of transforming and permissive Epstein-Barr virus infections. *J Virol* 2000;74(16):7610-8.

Wurapa AK, Luque AE, Menegus MA. Oral hairy leukoplakia: a manifestation of primary infection with Epstein-Barr virus? *Scand J Infect Dis* 1999;31:505-6.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 104/05

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Detecção do vírus Epstein-Barr (EBV) por meio da técnica de hibridização in situ em lesões sugestivas de leucoplasia pilosa*", de responsabilidade do Pesquisador **Paulo Henrique Braz da Silva**, sob orientação da Professora Doutora **Marina Helena Cury Gallotini de Magalhães**.

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, 01 de julho de 2005

Prof. Dr. Rogério Nogueira de Oliveira
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Ficha de solicitação de exame anátomo-patológico do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

SERVIÇO DE PATOLOGIA CIRURGICA

Pedido de exame:

ANATOMO-PATOLÓGICO

CITOLÓGICO:

1 N.º LAB. 7

8 N.º R. G. 14

15 NOME DO PACIENTE 44

45 NOME DO OPERADOR 60

65 DISCIPLINA 80

1 USO DO LAB. 7

8 DATA 13

14 SEXO

15 RAÇA

16 IDADE 17

18 USO DO LAB. 21

22 SINTOMATOLOGIA

Masc. = 1 Branca = 1
Fem. = 2 Negra = 2
 Amarela = 3
 Outras = 4

23 TAMANHO DA LESÃO EM mm 24

25 ASPECTO DA LESÃO

26 ASPECTO RADIOGRÁFICO

27 DURAÇÃO DA LESÃO 32

33 VITALIDADE DENTAL

Lesões maiores que 100 mm coloque o n.º 99

Branca = 1
Vermelha = 2
Ulcerada = 3
Outras = 7

Radiolúcido = 1
Radiopaco = 2
Outros = 4

Positiva = 1
Negativa = 2
Não foi aplicado = 3

34 TIPO DE BIÓPSIA

35 FIXADOR

36 USO DO LAB.

37 USO DO LAB. 46

Incisional = 1
Excisional = 2
Curetagem = 3
Aspiração = 4
Peça Cirúrgica = 5

Formol = 1
Outros = 2

LOCAL DA LESÃO

DIAGNÓSTICO CLÍNICO

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES: