



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS EPSTEIN-  
BARR (EBV) EM MANAUS E PRESIDENTE FIGUEIREDO

CARLOS EDUARDO DE CASTRO ALVES

Manaus-AM

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

CARLOS EDUARDO DE CASTRO ALVES

EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS EPSTEIN-  
BARR (EBV) EM MANAUS E PRESIDENTE FIGUEIREDO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**ORIENTADOR:** DR. MARCUS TOLENTINO SILVA

**CO-ORIENTADOR:** DR. GEMILSON SOARES PONTES

Manaus – AM

2018

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A474e Alves, Carlos Eduardo de Castro  
Epidemiologia da Infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) em residentes de Manaus e Presidente Figueiredo / Carlos Eduardo de Castro Alves. 2018  
84 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Marcus Tolentino Silva  
Coorientadora: Gemilson Soares Pontes  
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. soroprevalência. 2. epstein-barr. 3. susceptibilidade. 4. Manaus. 5. Presidente Figueiredo. I. Silva, Marcus Tolentino II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

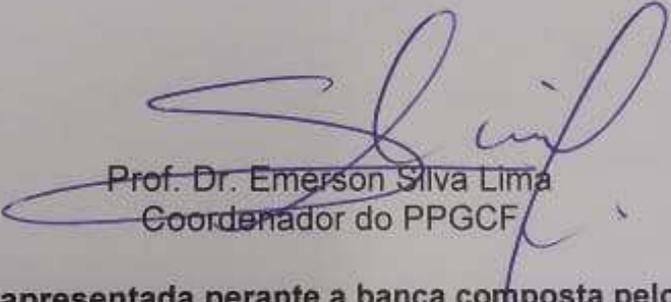
**“Epidemiologia da infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) em residentes de Manaus e Presidente Figueiredo”.**

**DISCENTE: CARLOS EDUARDO DE CASTRO ALVES**

**PARECER:**

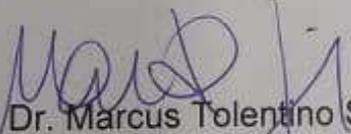
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 20/06/2018.

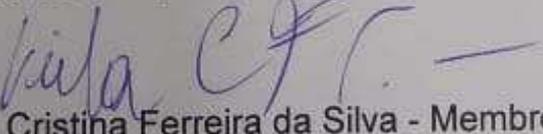


Prof. Dr. Emerson Silva Lima  
Coordenador do PPGCF

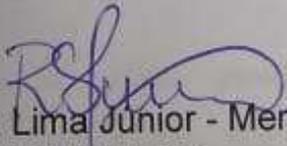
**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:**



Prof. Dr. Marcus Tolentino Silva  
Orientador e presidente da banca



Profª. Drª. Leila Cristina Ferreira da Silva - Membro externo  
Membro externo (FVS/AM)



Prof. Dr. Raimundo Sousa Lima Junior - Membro interno  
Membro interno (UEA)

À minha amada família, amigos e  
professores que me incentivaram e  
ajudaram a chegar até aqui.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu bom Deus por ter me sustentado e mantido forte durante todo o meu caminhar. Pelo seu amor incondicional para comigo.

À minha amada e preciosa família, em especial meus pais, meu irmão, meus sobrinhos e minha cunhada, por me amarem e apoiarem em todos os seguimentos da minha vida. Eu os amo mais que tudo!

Agradeço ao meu orientador, Professor Marcus Tolentino, por ter me aceito como seu orientando, pelos seus ensinamentos, paciência e disponibilidade para comigo. Foi uma oportunidade imensa poder ser orientado pelo senhor.

Ao meu querido co-orientador, Professor Gemilson Soares Pontes, por seus ensinamentos, suportes e pelas muitas repreensões, mas que foram essenciais para formar meu caráter acadêmico. Agradeço aos momentos “psicólogo” que sempre teve com seus alunos e por ter compartilhado conosco tantas experiências, ensinamentos de vida e ter nos ajudado a crescer como profissionais na área da pesquisa. Conte comigo sempre!

À Universidade Federal do Amazonas – UFAM e todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela construção do meu caráter acadêmico e profissional. Agradeço especialmente ao professor José Pereira Moura Neto que me auxiliou e disponibilizou, sem empecilhos, seu laboratório de biologia molecular para minhas atividades referentes e que sempre nos ensinou de forma magnífica. Obrigado, camarada!

Aos meus amados amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia - INPA: Daniele, Danniell, Diana, Emmily, Jaqueline, Jean, Karinna, Natália, Regiane e Thiago. Pelo auxílio em procedimentos, pela torcida e por serem uma família para mim. Agradeço aos momentos de ensinamentos, conversas, aos desabafos na mesa da copa ou na sala de estudo. A todos o meu carinho e admiração.

Aos discentes do PPGCF por terem acolhido sempre tão bem o único biólogo da turma e terem compartilhado seus conhecimentos na área de farmácia, ao qual tenho grande admiração. Agradeço em especial aos meus amigos Lima, Raison, Ribeiro e Sara pela união e cumplicidade, pelos ensinamentos e saídas a diversos rodízios.

Ao prédio de Microbiologia Médica como um todo, onde estive durante o decorrer do mestrado. Agradeço ao Dr. Mauricio, João e Máisa por sempre disponibilizarem ajuda para realização de minhas atividades. Aos meus queridos amigos do laboratório de Micologia pelos auxílios. Ao corpo técnico, senhor Francisco e Raimundo. E a nossa querida “mãe” Vanusa, pelos cafés da manhã, almoços e por todo seu carinho para com seus “filhos”.

As minhas amadas amigas Rosa e Larissa. Rosa por ter me incentivado à realização da seleção de mestrado do PPGCF, pelas reuniões para estudo e por ser um dos amores da minha vida. Assim como Larissa, que em meio a chuva forte encarou qualquer engarrafamento para que eu chegasse a tempo para a prova de seleção e por ser minha melhor amiga, companheira. A vocês todo meu amor.

Agradeço ao meu querido e eterno mentor, Raimundo Souza Lima Júnior, por ter me incentivado ao caminho da ciência através da seleção de PAIC-UEA sob sua orientação e ao qual tenho enorme carinho.

E a todos que de alguma forma, seja ela direta ou indiretamente, ajudaram na realização dessa etapa tão importante na minha vida. Obrigado!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

## RESUMO

O vírus Epstein-Barr (EBV) é frequente e acomete 95% da população adulta mundial, com destaque nos países em desenvolvimento. No Brasil, poucos são os dados epidemiológicos atuais sobre a infecção pelo EBV, principalmente na região Norte. Dessa forma, o objetivo do projeto foi identificar o perfil soropidemiológico da infecção por EBV na cidade de Manaus e Presidente Figueiredo ao analisar sua soroprevalência, níveis séricos de IgG anti-EBV e características sociodemográficas. Para isso, o projeto parte de um estudo transversal originado de um inquérito de base populacional previamente realizado. Foram coletadas 579 amostras biológicas de residentes da região de Manaus e Presidente Figueiredo, com idade de 0 a 81 anos de idade. Para a determinação da soroprevalência, foi realizado o diagnóstico sorológico das amostras de soro para a identificação de anticorpos IgG anti-EBV por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa STATA 14.2 e Prism 5.0. Em todas as análises estatísticas foram consideradas significantes aquelas que obtiveram valor de  $p < 0,05$ . Os resultados mostram uma soroprevalência de 92,23% para infecção por EBV entre os indivíduos estudados. Participantes de Manaus (96,32%,  $p=0,041$ ), mulheres (94,13%;  $p=0,029$ ), adultos entre 20 a 29 anos (95,73%;  $p= 0,024$ ) e indivíduos com ensino superior (100%;  $p=0,001$ ) apresentaram maior soropositividade para infecção por EBV e sugerem que esses grupos estão mais susceptíveis à infecção pelo EBV. Valores de nível sérico de IgG anti-EBV foram significativamente maiores em mulheres, participantes com anemia e indivíduos de 60 anos ou mais. Os resultados aqui apresentados de importância para vigilância em saúde, pois apresentam dados de susceptibilidade para infecção por EBV e auxiliarão em estratégias de contenção e conscientização.

**Palavras-chave:** soroprevalência; EBV; susceptibilidade, Manaus, Presidente Figueiredo

## ABSTRACT

Epstein-Barr virus (EBV) is widespread, affecting about 95% of the world's adult population, in which the majority of those infected are from developing countries. In Brazil, there are few current epidemiological data for EBV infection, especially about Northern region. Thus, the aim of the project was to identify the seroepidemiological profile of EBV infection in the city of Manaus and Presidente Figueiredo when analyzing its seroprevalence, serum levels of anti-EBV IgG and sociodemographic characteristics. For this, the project starts from a cross-sectional study originated from a previously population-based survey. A total of 579 biological samples were collected from residents of Manaus and Presidente Figueiredo, aged 0 to 81 years. For the determination of seroprevalence, serological diagnosis of serum samples was performed for the identification of anti-EBV IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All statistical analyzes were performed using the STATA and Prism 5.0 software. In all the statistical analyzes, those that obtained p value  $<0.05$  were considered significant. The results show a 92.23% seroprevalence for EBV infection among the individuals studied. Participants in Manaus (96.32%,  $p = 0.041$ ), women (94.13%,  $p = 0.029$ ), adults between 20-29 years (95.73%;  $p = 0.024$ ) and people with higher education (100%;  $p=0,001$ ) presented greater seropositivity for EBV infection and also suggesting that these groups are more susceptible to EBV infection. Serum levels of anti-EBV IgG were significantly higher in women, participants with anemia, and individuals aged 60 years or older. The results presented here are of importance for health surveillance, since they present susceptibility data for EBV infection, assisting in strategies of containment and awareness.

**Keywords:** seroprevalence; EBV; susceptibility; Manaus, Presidente Figueiredo.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura do vírus Epstein-Barr.....	22
<b>Figura 2.</b> Genoma de latência do vírus Epstein-Bar.....	30
<b>Figura 3.</b> Níveis séricos de IgG de acordo com fatores sociodemográficos (450nm).....	53
<b>Figura 4.</b> Valores de séricos de IgG através de absorvância (450nm) em relação a idade dos participantes.....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Expressão de genes de acordo com a etapa do ciclo viral e suas respectivas funções.....	23
<b>Tabela 2.</b> Soroprevalência da infecção pelo vírus EBV em residentes da região metropolitana de Manaus.....	48
<b>Tabela 3.</b> Soroprevalência da infecção por EBV quanto a cidade origem das amostras dos participantes.....	49
<b>Tabela 4.</b> Soroprevalência da infecção por EBV de acordo com o gênero dos participantes.....	49
<b>Tabela 5.</b> Soroprevalência da infecção por EBV de acordo com a Idade (anos) dos participantes.....	50
<b>Tabela 6.</b> Soroprevalência da infecção por EBV de acordo com o grau de instrução dos participantes.....	51
<b>Tabela 7.</b> Soroprevalência da infecção por EBV de acordo com participantes com anemia ou sem anemia.....	51

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Proteínas de latência do EBV produzidas de acordo com a fase de latência.....	31
--	----

## LISTA DE APÊNDICE E ANEXO

<b>Apêndice A:</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para “Fatores associados ao acesso de uso de insumos e serviços de saúde na zona Metropolitana de Manaus.....	76
<b>Apêndice B:</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para “Análise molecular, imunológica, bioquímica e hematológica das infecções pelos vírus Citomegalovírus (CMV) e Epstein-Barr (EBV) e o desenvolvimento da autoimunidade.....	77
<b>Apêndice C:</b> Inquérito Epidemiológico – Manaus.....	70
<b>Apêndice D:</b> Inquérito Epidemiológico – Presidente Figueiredo.....	82
<b>Anexo A:</b> Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).....	82

## LISTA DE ABREVIACÕES

**CN** – Carcinoma de nasofaringe

**CTH** - Células-tronco hematopoiéticas

**DNA** – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

**dNTP** - deoxinucleotídeos

**EA** – Antígeno precoce

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

**EBV** – *Epstein-Barr vírus*

**EII** – Ensaio de Imunofluorescência Indireta

**ELISA** - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoadsorção Enzimática)

**HHV-4** - Herpesvirus-humano-4

**HIV** – *Human immunodeficiency vírus* (vírus da imunodeficiência humana)

**HLA** – *Human leukocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)

**IARC** – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer)

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IL-10** – Interleucina-10

**LB** - Linfoma de Burkitt

**LH** - Linfoma de Hodgkin

**LMP** – *Latent membrane protein*(Proteína de membrana latente)

**LnH** – Linfoma não Hodgkin

**MI** - Mononucleose infecciosa

**Nm** - nanómetro

**PBMCs** – *peripheral blood mononuclear cells* (células mononucleares de sangue periférico)

**PCR** – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia de polimerase)

**ssDNA** – *single-stranded DNA* (DNA de cadeia simples)

**TCN** - Tumorigênese do carcinoma de nasofaringe

**VCA** – *Viral capsid antigen* (Antígeno do capsídeo viral)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1. Breve histórico .....	19
2.2. Estrutura e genoma do EBV .....	21
2.3. Ciclo viral do EBV .....	25
2.3.1. Fase precoce-imediata .....	25
2.3.2. Fase precoce .....	26
2.3.3. Fase tardia .....	27
2.4. Latência do EBV .....	28
2.5. Reativação .....	31
2.7. Epidemiologia da infecção pelo EBV .....	33
2.7.1. Epidemiologia da infecção por EBV no mundo .....	33
2.7.2. Epidemiologia da infecção por EBV no Brasil .....	34
2.8. Principais doenças associadas à infecção por EBV .....	35
2.9. Diagnóstico do EBV .....	37
2.10. Tratamento .....	39
<b>3. OBJETIVO</b> .....	41
3.1. Objetivo Geral .....	41
3.2. Objetivos Específicos .....	41
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
4.1. Modelo de Estudo .....	42
4.2. Comitê de Ética .....	42
4.3. População de Estudo .....	42
4.3.1. População de Manaus .....	42
4.3.2. População de Presidente Figueiredo .....	42
4.4. Critérios de Inclusão .....	43

4.5. Critérios de Exclusão .....	43
4.6. Obtenção de amostras biológicas.....	43
4.8. Diagnóstico sorológico da infecção por EBV.....	44
4.9. Variáveis .....	44
4.11. Garantias éticas .....	45
4.12. Riscos e benefícios.....	45
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>47</b>
5.1. Soroprevalência para infecção por EBV.....	47
5.2. Níveis séricos de IgG anti-EBV.....	51
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
6.1. Resultados principais.....	54
6.2. Limitações.....	60
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em 1964, Michel Epstein, Yvonne Barr e sua equipe, por meio de microscopia eletrônica, detectaram pela primeira vez o vírus Epstein-Barr (EBV) em células cancerígenas isoladas de um linfoma endêmico na África, o linfoma de Burkitt (EPSTEIN; ACHONG; BARR, 1964). Trata-se de um vírus de grande incidência e prevalência em humanos, que apresenta ampla distribuição mundial e está diretamente associado a diversas doenças como mononucleose infecciosa (MI), linfoma de Burkitt (LB), linfoma de Hodgkin (LH), dentre outras (BELL; RICKINSON, 2003; JHA; PEI; ROBERTSON, 2016).

O EBV é classificado como herpesvírus-humano 4 (HHV-4) e pertence à família *Herpeviridae* e subfamília *Gammavirinae*. É um vírus icosaedro envelopado, possui DNA como seu material genético e tem grande afinidade por células epiteliais da nasofaringe e orofaringe, assim como linfócitos B (OLIVEIRA et al., 2012). Sua afinidade por células epiteliais da nasofaringe e orofaringe fazem com que sua principal via de transmissão seja a saliva (CHESNOKOVA; NISHIMURA; HUTT-FLETCHER, 2009a)

No mundo todo, estima-se que 95% da população adulta seja soropositiva para a infecção por EBV, que se caracteriza por ser assintomática em sua grande maioria e possui forte relação de susceptibilidade com fatores socioeconômicos e sociodemográficos, como renda familiar, escolaridade e faixa etária (BALFOUR et al., 2015). De acordo com estudos, países subdesenvolvidos apresentam uma maior prevalência para a infecção quando comparados a alguns países desenvolvidos (ALEBOUYEH et al., 1984; SUNTORNLOHANAKUL et al., 2015). No Brasil, a infecção pelo EBV ainda é bastante negligenciada e poucos estudos atuais e referentes à epidemiologia do vírus são publicados, principalmente na região Norte.

A infecção por EBV é, muitas das vezes, assintomática na infância e pode estabelecer persistência de forma latente durante toda a vida do hospedeiro (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). Por outro lado, o EBV está relacionado como causador de diversas doenças, dentre elas a mononucleose infecciosa, causando febre intensa e inchaços na garganta (NAKAOKA et al., 2013).

Para a detecção do EBV, a sorologia, biópsia de tecido infectado e PCR são os principais procedimentos adotados para o diagnóstico do EBV (DE PASCHALE; CLERICI, 2012; YAP et al., 2007). Quanto ao tratamento para esta infecção, a utilização de nucleosídeos acíclicos é o mais indicado, no qual o aciclovir e o ganciclovir são as principais drogas de escolha, pois atuam na inibição do ciclo lítico do EBV (GERSHBURG; PAGANO, 2005).

A grande abrangência da infecção pelo vírus Epstein-Barr ligado a doenças de alta morbidade ocasionadas pelo mesmo o tornam alvo de importante estudo que visam entender de que forma e como se dá a infecção por esse herpesvírus. Dados como estes são de importância para vigilância em saúde e a busca de medidas profiláticas para a infecção pelo EBV. Através disso, o projeto visou caracterizar o perfil soropidemiológico da infecção por EBV na região de Manaus e Presidente Figueiredo ao analisar sua soroprevalência e características sociodemográficas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Breve histórico

No ano de 1958, um cirurgião de Uganda, Dennis Burkitt, identificou pela primeira vez um linfoma endêmico na África subsaariana que afetava principalmente crianças, chamado de linfoma de Burkitt (BURKITT, 1958). Burkitt enviou amostras desse linfoma aos pesquisadores Michel Epstein e Yvonne Barr, que em 1964 publicaram um artigo na revista *Lancet* com os achados da análise desse material. Através de microscopia eletrônica os pesquisadores identificaram, nas células do linfoma, a presença de partículas virais com características similares às apresentadas por vírus da família Herpesviridae, passando a denominá-las de vírus Epstein-Barr (EPSTEIN; ACHONG; BARR, 1964). Nos anos seguintes diversas pesquisas foram realizadas com o intuito de descobrir mais características do EBV, assim como sua associação com outras doenças.

Em 1966, o EBV foi relacionado à tumorigênese do carcinoma nasofaríngeo e teve sua infecção confirmada em 1973 ao ter seu genoma detectado em células epiteliais oriundas de CN através de imunofluorescência indireta (OLD et al., 1966; WOLF, H., ZUR HAUSEN, H., BECKER, 1973). No ano seguinte, Henle e colaboradores (1968) ligaram o EBV como causa da mononucleose infecciosa, que na época era tida como febre ganglionar aguda, ao encontrarem anticorpos contra o vírus em amostras de pacientes diagnosticados com a doença. Similarmente, um estudo desenvolvido por Levine e colaboradores (1971) constataram a presença de anticorpos contra EBV em pacientes portadores de linfoma de Hodgkin, no qual verificaram a possível associação desta doença com a infecção pelo vírus.

O carcinoma nasofaríngeo também é uma patologia humana ligada à infecção por EBV. Na China, Zeng e colaboradores (1985), ao analisarem pacientes com CN, observaram a presença de IgA anti-VCA para EBV nas amostras e atribuíram o desenvolvimento da doença ao vírus. Posteriormente, esta associação foi fortalecida através de um estudo que detectou a presença de duas proteínas de latência do EBV, EBNA1 e LMP, em amostras de CN (YOUNG et al., 1988).

No ano de 1974 a técnica de imunofluorescência anti-complemento foi desenvolvida para detectar a proteína viral EBNA1 (antígeno nuclear do Epstein-Barr) em células de linfoma de Burkitt de pacientes, no qual de 13 indivíduos, 11 apresentaram o antígeno através da técnica (REEDMAN et al., 1974). A relação entre o vírus e o LB ficou clara com a divulgação do estudo prospectivo realizado por de-Thé e colaboradores (1978) em crianças de Uganda diagnosticadas com a doença. No caso, eles descobriram um alto nível de partículas virais na maior parte das crianças estudadas.

Além das associações com diversas doenças, os pesquisadores sempre procuraram entender a biologia do EBV, os mecanismos que tangem seu ciclo viral. Em 1982, a função do antígeno nuclear do Epstein-Barr-2 (EBNA2) foi atribuída a imortalização de células B infectadas (RABSON et al., 1982). Posteriormente, Wang e colaboradores (1985) observaram que a proteína de membrana latente 1 (LMP1) causava certas mudanças nas células testadas, como alteração morfológica e resistência ao efeito inibidor de crescimento celular do meio contendo baixo soro e classificaram-na como um oncogene. No mesmo ano, descobriu-se que outro antígeno viral, o EBNA1, é responsável pela manutenção viral na fase de latência, permitindo que o DNA do EBV se mantenha na forma episomal (YATES; WARREN; SUGDEN, 1985). Porém, o EBV pode ser reativado pela produção de um gene viral, o BZLF1, como mostrou o estudo de Countryman e Miller (1985), que observou uma maior intensidade de replicação lítica com a expressão de tal gene.

Em 1984, Baer e colaboradores sequenciaram pela primeira vez o genoma do EBV, por meio de didoxinucleotideo/M13, assim como tentaram entender a expressão de seus genes e suas funções em diferentes ciclos do vírus. De acordo com o estudo, o genoma do EBV tem 172.282 pares de base (pb), porém ainda não tinham conhecimento do número total de proteínas expressadas.

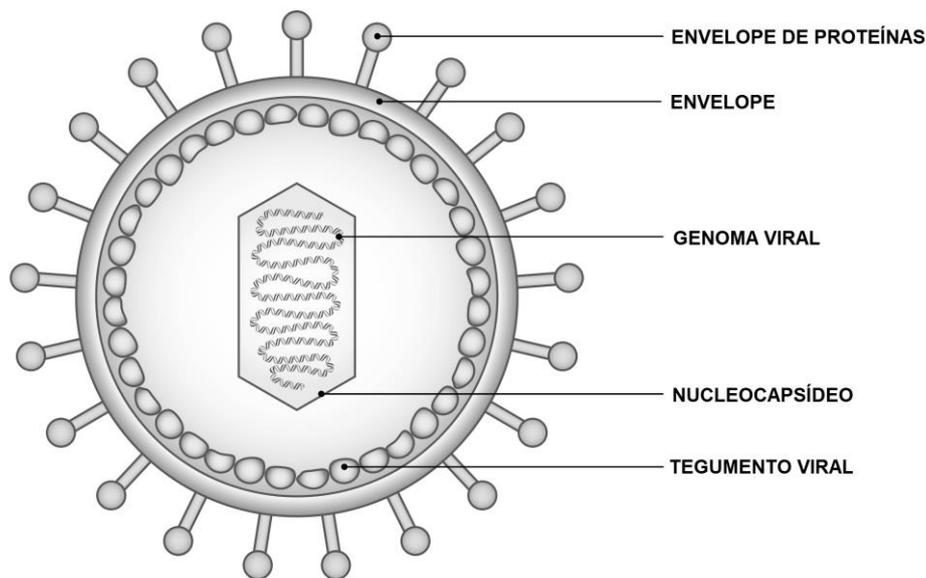
O EBV também apresenta dois genótipos, EBV-1 e EBV-2. Sample e colaboradores (1990) descobriram que os dois subtipos diferem em determinadas sequências de nucleotídeos dos genes virais responsáveis pela produção das proteínas EBNA-3A, EBNA-3B e EBNA-3C. Em 1993, tais proteínas também foram descritas como essenciais para a transformação de células B infectadas pelo EBV (TOMKINSON; ROBERTSON; KIEFF, 1993).

No Brasil, os primeiros estudos epidemiológicos relacionados ao EBV foram descritos por Black e colaboradores no ano de 1970 e 1974. Eles analisaram a prevalência de diversos herpesvírus, dentre eles o EBV, em tribos indígenas isoladas na Amazônia, como os Tiriyo e Kayapós. Esses estudos ressaltaram a grande abrangência do EBV a nível global ao ser constatado infecção em tribos distantes da sociedade urbanizada.

Assim, o EBV foi o primeiro vírus tumoral a ser descoberto e que continua a ser estudado e associado a um vasto número de doenças humanas (JHA; PEI; ROBERTSON, 2016).

## **2.2. Estrutura e genoma do EBV**

Dentre os 8 herpesvírus humanos que compõem a família *Herpesviridae*, o EBV é classificado como herpesvírus-humano 4 (HHV-4) e pertence a subfamília *Gammaherpesvirinae* (GRYWALSKA; ROLINSKI, 2015). Apresenta simetria icosaédrica envelopado, com tamanho aproximado de 150 nm de diâmetro e possui capsídeo formado por 162 capsômeros (**Figura 1**). Seu genoma viral é constituído de uma molécula de DNA de fita dupla linear de 172 Kpb, que codifica aproximadamente 100 proteínas virais (ARVEY et al., 2012). Entre o capsídeo e o envelope há um tegumento de glicoproteínas que é essencial para as funções do EBV como tropismo celular e o reconhecimento do receptor da célula hospedeira (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011)



**Figura 1.** Estrutura do vírus Epstein-Barr (EBV)

Adaptado de Wikimedia Commons

O EBV tem dois genótipos, EBV-1 e EBV-2, que se diferenciam principalmente na sequência de nucleotídeos de genes responsáveis pela expressão de proteínas virais, como, por exemplo, EBNA-2; com 54% de homologia dentre os dois genótipos; EBNA-3A, EBNA-3B e EBNA-3C (SAMPLE et al., 1990; SMATTI et al., 2017). Os dois genótipos também diferem na capacidade de imortalização de células B, no qual o EBV-1 é mais eficaz comparado ao EBV-2, que por sua vez só é capaz de imortalizar células B de indivíduos imunocomprometidos (BUCK et al., 1999; RICKINSON; YOUNG; ROWE, 1987). Quanto sua distribuição, o EBV-1 é o mais comum e encontrado globalmente, principalmente no sudeste da Ásia e hemisfério ocidental, diferente do EBV-2 que se está presente com mais frequência no continente africano (ABDEL-HAMID et al., 1992).

Para o ciclo viral do EBV, composta pelas fases lítica, latência e reativação, vários genes participam na manutenção de cada uma dessas etapas, conforme mostra a **Tabela 1**.

**Tabela 1. Genes participantes no ciclo viral do Epstein-Barr e suas respectivas funções.**

<b>GENE</b>	<b>PROTEÍNA</b>	<b>FUNÇÃO</b>
<b>REPLICAÇÃO LÍTICA</b>		
<b>FASE PRECOCE-IMEDIATA</b>		
<i>BZLF1</i>	ZEBRA ou Zta	Transativação, iniciador da fase lítica
<i>BRLF1</i>	Rta	Transativação, iniciador da fase lítica
<b>FASE PRECOCE</b>		
<i>BMRF1</i>	-	Transativação
<i>BALF2</i>	mDBP	Proteína de ligação do DNA (ssDNA)
<i>BALF5</i>	DNA polimerase	Replicação viral, atividade exonucleolítica
<i>BORF2</i>	Enzima ribonucleotídeoredutase viral	Catalisa a síntese de desoxirribonucleotídeos
<i>BARF1</i>	Enzima ribonucleotídeoredutase viral	Catalisa a síntese de desoxirribonucleotídeos
<i>BXLF1</i>	EBV-TK	Quinase de timidina
<i>BGLF4</i>	EBV-PK	Proteína quinase
<i>BGLF5</i>	Enzima exonuclease alcalina	
<i>BSLF1</i>	Primase	Replicação do DNA viral
<i>BBLF4</i>	Helicase	Replicação do DNA viral
<i>BKRF3</i>	Glicosilase de uracila-DNA	Reparação do DNA viral
<b>FASE TARDIA</b>		
<i>BGLF4</i>	-	Transativação

<b><i>BMRF2</i></b>	-	Tropismo viral com células epiteliais
<b><i>BLLF1</i></b>	gp350/220	Nucleocapsídeo viral
<b><i>BXLF2</i></b>	gp85 (gH)	Glicoproteína de fusão
<b><i>BKRF2</i></b>	gp25 (gL)	Glicoproteína de fusão
<b><i>BZLF2</i></b>	gp42	Glicoproteína de fusão
<b><i>BALF4</i></b>	gp110 (gB)	Auxilia no tropismo viral
<b><i>BDLF3</i></b>	gp100-150	Evasão imunitária
<b><i>BILF2</i></b>	gp55-78	Evasão imunitária
<b><i>BCRF1</i></b>	IL-10	Evasão imunitária
<b><i>BPLF1</i></b>	Deubiquitinase/denedilase	Evasão imunitária
<b>FASE DE LATÊNCIA</b>		
		Manutenção da forma epissomal; regulação da transcrição do DNA viral
<b><i>BKRF1</i></b>	EBNA-1	
<b><i>BYRF1</i></b>	EBNA-2	Transativação
<b><i>BERF1</i></b>	EBNA-3A	Regulação na transcrição do DNA viral
<b><i>BERF2</i></b>	EBNA-3B	Sem informações na literatura
<b><i>BERF3/4</i></b>	EBNA-3C	Regulação na transcrição do DNA viral
<b><i>BWRF1</i></b>	EBNA-LP	Transativação
<b><i>BNLF1</i></b>	LMP-1	Inibição da apoptose da célula hospedeira
<b><i>BNRF1</i></b>	LMP-2	Manutenção da fase de latência, inibição da reativação do EBV
<b><i>EBER1/2</i></b>	-	Regulação da imunidade inata, anti-apoptose

Adaptado: IARC, 1997.

### 2.3. Ciclo viral do EBV

O EBV inicialmente infecta células epiteliais da orofaringe e nasofaringe através da interação entre o componente viral BMRF-2 com integrinas  $\beta 1$  da célula hospedeira, seguida pela interação com as integrinas  $\alpha\beta 6/8$ , mediada pelo complexo de glicoproteínas de superfície gH/gL que auxilia na entrada do vírus na célula por meio da endocitose (CHESNOKOVA; NISHIMURA; HUTT-FLETCHER, 2009b).

Como os demais herpesvírus, o EBV tem grande afinidade por linfócitos B *naive*. Para a infecção dessas células, a proteína viral gp350/220 se liga à proteína celular CD21, logo outras três proteínas virais, gp85, gp25 e gp42, interagem com as moléculas HLA de classe II das células B, assim há adsorção do vírus e o EBV adentra através de endocitose (HUTT-FLETCHER, 2007; TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005).

Em sequência da infecção celular ocorre o desnudamento do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira e o genoma do EBV é transportado até o núcleo, onde é inserido ao material genético humano, replicado e transcrito por DNA polimerases caracterizando a fase lítica do vírus. O EBV também pode entrar em modo de latência viral logo após ser inserido no DNA da célula hospedeira (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005).

A fase lítica do EBV possibilita que o vírus se replique, cresça e infecte outras células. Esta fase é dividida em três etapas: precoce-imediata, precoce e tardia (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005)

#### 2.3.1. Fase precoce-imediata

A fase inicial da replicação lítica é caracterizada pela produção de produtos génicos que atuam como transativadores e que intensificam a expressão de genes na fase posterior (KEATING et al., 2002).

O gene BZLF1 do EBV codifica a proteína viral Zta (também chamada de ZEBRA, ou Z) responsável por dar início a todo o processo lítico junto com o segundo produto, a proteína Rta (ou R) codificada pelo gene BRLF1 (GERMI et al., 2016; IARC,

1997). Essas duas proteínas também apresentam importante função na interrupção do estado de latência do EBV em indivíduos imunocomprometidos e que leva a reativação viral e replicação lítica (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005; ZHAO et al., 2015). Além disso, Li e colaboradores (2016) descobriram que BZLF1 atua na inibição da expressão de citosinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , o que leva a uma maior eficiência da replicação lítica do EBV, visto que as mesmas funcionam como uma estratégia antiviral do organismo.

### 2.3.2. Fase precoce

A fase precoce possui uma maior participação de genes líticos e está ligada diretamente a replicação do DNA do EBV em si. São os genes mais importantes nessa etapa: BMRF1, BALF2, BALF5, BORF2, BARF1, BGLF5, BSLF1, BBLF4, BKRF3 (KEATING et al., 2002; IARC, 1997).

BMR1, assim como *BZLF1* e *BRLF1*, é um transativador na fase precoce e que regula transcrição viral (IARC, 1997). De acordo com NAKAYAMA e colaboradores (2009), BMR1 é um componente importante, pois também atua na forquilha de replicação viral como um fator de progressividade da DNA polimerase. Além disso, BMR1 age como cofator de BZLF1 na expressão de BALF2 que por sua vez é responsável por produzir proteína de ligação ao DNA de fita simples (ssDNA), a mDBP (MUMTSIDU et al., 2008).

O gene BALF5 codifica a DNA polimerase (5' a 3'), capaz de sintetizar cadeias muito longas de DNA do EBV sem que haja dissociação do molde e atuar na atividade exonucleolítica da revisão intrínseca de 3' a 5' (FUJII et al., 2000; IARC, 1997).

BORF2 junto com BARF1 expressam a enzima ribonucleotídeo redutase viral. Essa enzima catalisa a velocidade da formação 2'deoxirribonucleotídeos, necessários para a polimerização do DNA viral e reparação (KOLBERG et al., 2004).

BGLF5 codifica a enzima exonuclease alcalina, necessária para a eficiência da síntese do material genético viral e no bom processamento do genoma viral linear, devido catalisar a separação dos nucleotídeos localizados nas extremidades do DNA viral (HORST et al., 2012; IARC, 1997). Tem papel, também, na fuga imune do

organismo, pois reduz a capacidade da célula hospedeira de expressar complexos de histocompatibilidade, como moléculas HLA I e II durante a replicação do EBV e que leva ao não reconhecimento por células T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> (FEEDERLE et al., 2009a). Ainda de acordo com Feederle e colaboradores (2009b), a ausência desse gene na fase lítica prejudica a encapsidação do EBV, assim como a saída nuclear e a posterior infecção do vírus a novas células.

BSLF1 e BBFL4 codificam as enzimas primase e helicase, respectivamente, essenciais para a replicação do EBV nesta fase. BKRF3 origina a enzima glicosilase de uracila-DNA encarregada do reparo do DNA viral ao remover a uracila inadequada do material genético do EBV e auxiliar na eficácia da replicação ao interagir com proteínas do complexo de replicação viral (LU et al., 2007; SU et al., 2014).

### **2.3.3. Fase tardia**

Nesta última fase da replicação lítica os genes expressos são responsáveis pela produção de proteínas estruturais para a montagem do nucleocapsídeo viral, essencial para o tropismo do EBV (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005). Junto ao transativador Zta, o gene BGLF4 participar como regulador desta fase (MCKENZIE et al., 2016).

Um dos principais genes nesta etapa, BLLF1, codifica a glicoproteína gp350/220 que forma o envelope principal do EBV (IARC, 1997). Está glicoproteína inicia a ligação do EBV à proteína CD21 de células B (HUTT-FLETCHER, 2007). A gp350/220 também é alvo de estudos para a criação de uma vacina profilática para EBV devido sua capacidade de infecção inicial do vírus (OGEMBO et al., 2015).

Os genes BXLF2, BKRF2, BZLF2 e BALF4 produzem o complexo de glicoproteínas gp85 (gH), gp25 (gL), pg42 e gp110, respectivamente (IARC, 1997). Elas se ligam as moléculas HLA de classe II de células B e auxilia a adsorção do EBV, assim, há a entrada do vírus por endocitose (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011; TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005).

BDLF3, BILF2, BCRF1 e BPLF1 originam, respectivamente, os produtos gp100-150, gp55/78, interleucina 10 (IL-8) viral e deubiquitinase/denedilase (MCKENZIE et al., 2016; IARC, 1997). Tais produtos suprimem as respostas imunitárias antivirais do

EBV no decorrer de sua infecção primária (MCKENZIE et al., 2016). Isso ocorre principalmente pela ação de BDLF3 em tentar inibir a expressão de MHC I e II ao internalizar e dificultar o surgimento dessas moléculas na superfície celular (QUINN et al., 2016). McKenzie e colaboradores (2016) sugerem que inibir a expressão desses genes impediria a reinfeção do EBV em novas células e possibilita o desenvolvimento de uma forma de tratamento para infecção pelo vírus.

#### 2.4. Latência do EBV

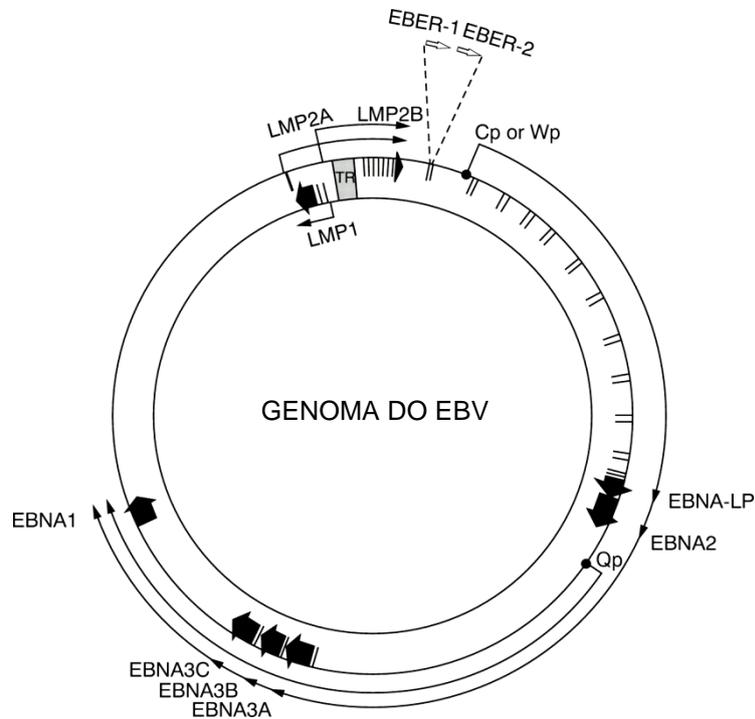
Após a infecção celular, o EBV pode passar por um estágio de latência, geralmente em linfócitos B, no qual, diferente da fase lítica, inexistente a produção de partículas virais (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). Nesta fase, o DNA viral deixa de ser linear, como na fase lítica, e passa a ser episomal (**Figura 2**), assim sua replicação é mediada pela DNA polimerase do EBV (RIBEIRO-SILVA; ZUCOLOTO, 2003).

Durante a fase lítica o EBV chega a expressar até 100 genes, porém na fase de latência há expressão chega a ser acerca de 10 genes (FITZSIMMONS; KELLY, 2017). Essa diminuição na expressão gênica é importante para que o vírus permaneça na célula de forma “silenciosa” a fim de evitar seu reconhecimento pelo sistema imune (RIBEIRO-SILVA; ZUCOLOTO, 2003). Esses genes produzem proteínas de latência que auxiliam na manutenção viral durante esse período, como os antígenos nucleares do Epstein-Barr (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-B, EBNA-3C e EBNA-LP) e proteínas de membrana latente (LMP-1 e LMP2A), além de RNAs não codificantes, os EBERs (1e 2) (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005).

Os EBNAs possuem funções variadas e essenciais na manutenção desse período, como o EBNA-1 que mantém o DNA viral na forma de epissomo circular dentro da célula infectada e EBNA-LP, tida como *leaderprotein*, necessária para a transformação de células B e se liga às proteínas pRb e p53, que tem papéis importantes no ciclo celular (KANG; KIEFF, 2015; TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005).

LMP-1 está ligada a sobrevivência das células B infectadas por meio de um mecanismo anti-apoptose, pois o domínio carboxi-terminal dessa proteína inibe a morte celular programada (PRATT; ZHANG; SUGDEN, 2012). LMP-2 atua na inibição da

imunoglobulina de superfície na mobilização de cálcio, além de evitar a reativação do EBV durante o processo de imortalização celular (ANTONIO; RABENHORST, 2006; MILLER et al., 1995).



**Figura 2. Genoma de latência do EBV**

Adaptado de Young; Dawson; Eliopoulos (2000)

Os EBERs são transcritos pela RNA polimerase III, possuem 167 (EBER-1) e 172 (EBER-2) nucleotídeos e são os componentes mais abundantes em células infectadas pelo EBV (IWAKIRI, 2014). É um dos principais motivos para o surgimento de tumores relacionados ao EBV, como linfoma de Burkitt, pois tem ação oncogênica e, além disso, apresentam capacidade de evitar a apoptose ao bloquearem o efeito da proteína c-Myc, pro-apoptótica (ANTONIO; RABENHORST, 2006; IWAKIRI, 2014).

O período de latência do EBV é dividido em três fases principais: III, II e I. Cada uma destas fases é caracterizada pela expressão específica de EBNAs, LMPs e EBERs e no comportamento da célula hospedeira (**Quadro 1**) (BABCOCK; HOCHBERG; THORLEY-LAWSON, 2000; TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005).

**Quadro 1. Proteínas de latência do EBV produzidas de acordo com a fase de latência**

GENE	BKRF1	BYRF1	BERF1	BERF2	BERF3/4	BWRF1	BNLF1	BNRF1	EBER	
PRODUTO	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3A	EBNA-3B	EBNA-3C	EBNA-LP	LMP-1	LMP-2A	EBER-1	EBER-2
LATÊNCIA 0										
LATÊNCIA I	X								X	X
LATÊNCIA II	X					X	X	X	X	X
LATÊNCIA III	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Durante infecção primária de células B *naive*, o EBV inicia o programa de latência III ou fase de crescimento, pois a célula é estimulada a proliferar e onde há a participação de todas as proteínas de latência (KANG; KIEFF, 2015). Em seguida, no programa de latência II, essas células B se transportam para o centro germinativo e o EBV inibe alguns de seus genes e passa a expressar apenas EBNA-1, LMP-1, LMP-2 e EBERs que auxiliam na diferenciação dessas células em células B de memória (KANG; KIEFF, 2015). Então, na última etapa, latência I, as células B de memória são lançadas na corrente sanguínea e o EBV expressa somente EBNA-1 e EBERs, que possibilitam a replicação viral enquanto ocorre a divisão celular (KANG; KIEFF, 2015; PRATT; ZHANG; SUGDEN, 2012). Algumas literaturas (CHIJOKE; LANDTWING; MÜNZ, 2016; KANG; KIEFF, 2015) ainda citam o programa 0 como um dos programas de latência do EBV, caracterizado pela inibição completa dos genes de latência e que ocorre logo após o programa I.

Através desse processo, o EBV permanece em estado de latência durante toda a vida do hospedeiro, ao menos que ocorra sua reativação através de fatores diversos (KANG; KIEFF, 2015; RIBEIRO-SILVA; ZUCOLOTO, 2003).

## 2.5. Reativação

Alguns fatores ocasionam a reativação do EBV do estado de latência, o que inicia o processo de replicação lítica em células hospedeiras, reinfecções e surgimento de doenças relacionadas (LI et al., 2016a; ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). A expressão dos genes BZLF1 e BRLF1 é um fator crucial para a reativação do vírus, pois os mesmos codificam as proteínas transativadores Zta e Rta, respectivamente, responsáveis por iniciarem todo o processo lítico do vírus ao estimularem a cascata de expressão de outros genes (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005).

O estresse oxidativo celular é um fator que leva a reativação do EBV. Um estudo utilizou peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>) em células B infectadas por EBV e em estado de latência e observou que houve uma alta expressão de BZLF1 durante o processo, o que levou a reativação do vírus (LASSOUED et al., 2010). A hipóxia também pode induzir a reativação, como mostra Jiang e colaboradores (2006) que avaliaram o efeito da hipóxia em células B95-8 infectadas e concluíram que houve um aumento significativo na produção de Zta, assim como o número de DNA do EBV.

O estresse é um fator psicológico que também leva a reativação de vírus herpes (GLASER et al., 1991; HUANG et al., 2011). Um estudo analisou pessoas ansiosas que tinham infecção por EBV e constatou que indivíduos mais ansiosos apresentaram um título mais elevado de IgG-VCA para o vírus do que aqueles menos ansiosos, devido a influência negativa da ansiedade sobre o sistema imunológico, o que leva à reativação viral (FAGUNDES et al., 2014).

A proteína EBNA-1, apesar de seu papel constatado na fase de latência, é o único antígeno nuclear do EBV que é expresso na replicação lítica e também gera a reativação do vírus (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005). Sivachandran e colaboradores (2012) realizaram a interação de EBNA-1 com a proteína da leucemia promielocítica (PML IV) e células sem PML e observou que EBNA-1 não promovia infecção lítica nestas últimas.

## 2.6. Transmissão do EBV

Por infectar primariamente células epiteliais da orofaringe e nasofaringe, a principal via de transmissão do EBV é a saliva (ANTONIO; RABENHORST, 2006; OLIVEIRA et al., 2012). LANG e colaboradores (1977) estudaram três populações da Malinésia, isoladas e distintas entre si, porém observaram altos padrões de aquisição precoce de anti-EBV entre as três populações. Quando analisado mais profundamente, observaram que as mães dessas regiões tinham um costume de mastigar o alimento antes de darem aos seus filhos. Assim, as crianças são mais suscetíveis a infecção primária por EBV, pois, também, estão em constantemente em contato com secreções orais ou utensílios que colocam na boca (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011).

Além da transmissão por via oral, o EBV é comumente transmitido via transfusão sanguínea, mesmo após o processo de leucorredução realizado por hemocentros (SMATTI et al., 2017). Transplantes de órgãos ou células troncos também são vias para infecção para o EBV. Um estudo realizado por Trottier e colaboradores (2012) procuraram detectar a presença de EBV em pacientes pediátricos após enxerto de células-tronco hematopoiéticas e observaram uma associação entre transfusões de CTH e o EBV.

Algumas literaturas citam a relação sexual como uma via possível para a infecção por EBV (HALVORSEN et al., 2006; HIGGINS et al., 2007). NAHER e colaboradores (1992) observaram que tanto o trato genital masculino quanto o feminino apresentam subclínicamente o EBV, da mesma forma que a cavidade oral, sugerindo a via sexual como forma de transmissão do vírus. Quanto à transmissão vertical, ela ainda é rara (OLIVEIRA et al., 2012).

## **2.7. Epidemiologia da infecção pelo EBV**

### **2.7.1. Epidemiologia da infecção por EBV no mundo**

O EBV está disseminado e infecta 95% da população mundial (BALFOU et al., 2015). Fatores como geografia, idade e sociodemografia estão fortemente atreladas à susceptibilidade de infecção pelo EBV.

Em países subdesenvolvidos, a infecção primária pelo EBV ocorre na faixa etária de 5 a 10 anos. No entanto, na maioria dos casos, essas crianças são assintomáticas para esta infecção (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). Por outro lado, em países desenvolvidos, como EUA e alguns países da Europa, a infecção primária é geralmente constatada entre adolescentes e adultos, seguida de sintomas de mononucleose infecciosa (BALFOUR et al., 2013; FOURCADE et al., 2017). Esta bimodalidade para infecção por EBV e o surgimento de sintomas pode ser explicado, pois, como a principal forma de transmissão do vírus é a saliva, a carga viral adquirida por uma criança através de um objeto contaminado é menor do que a obtida por um adolescente durante um beijo (KIMURA, 2006).

Países em desenvolvimento geralmente apresentam uma maior soroprevalência em sua população adulta. A superpopulação, saneamento básico e saúde pública dessas regiões são citadas como principais motivos para a ocorrência da alta taxa de infectados pelo EBV (ALEBOUYEH et al., 1984; SUNTORNLOHANAKUL et al., 2015).

A variação geográfica também está relacionada na prevalência dos genótipos do EBV. Como visto, os tipos 1 e 2 do vírus são encontrados em todo o globo, porém o 1 é mais prevalente, exceto em algumas regiões da África, no qual o tipo 2 possui maior prevalência (SAMPLE et al., 1990).

Fatores socioeconômicos e sociodemográficos estão relacionados à susceptibilidade para infecção por EBV. Estudos mostram que famílias de baixa renda e/ou baixa escolaridade tem uma alta soropositividade para infecção por EBV (FLEISHER *et al.*, 1979; HESSE *et al.*, 1983; MEKMULLICA; KRITSANEEPAIBOON; PANCHAROEN, 2003). O compartilhamento de materiais contaminados entre membros de uma grande família, como mostrado por Ozkan e

colaboradores (2003) podem ser hábitos de risco para infecção por EBV em família com baixa renda e um alto número de familiares morando em um mesmo local.

Nos EUA, estado de Minesota, Condon e colaboradores (2014) realizaram um estudo epidemiológico sobre infecção por EBV em crianças e adolescentes de 18 meses a 19 anos. O estudo identificou uma soroprevalência de 73,2%, no qual a maioria dos soropositivos para o vírus, quando estratificados em raça/etnia, eram negros, seguidos de asiáticos, hispânicos e por último brancos. Quanto a idade, a maior soropositividade foi observada entre meninos com idade entre 15 a 19 anos. O estudo também verificou que a soroprevalência dos estudados diminuiu com o aumento da escolaridade dos familiares, porém não associado a fator socioeconômico

Ozkan e colaboradores (2003) realizaram uma pesquisa na província de Elazig, Turquia, com indivíduos de 1 ano a maiores de 60 anos e observaram uma soroprevalência de 99,4% para IgG anti-VCA para EBV nas amostras estudadas. Houve um aumento significativo da soropositividade para EBV de acordo com a idade, família com muitos integrantes, exposição a locais públicos e baixa renda. No entanto, fatores como gênero e grau de instrução não apresentaram associação significativa com a infecção por EBV.

Em Qatar, amostras de soro de doadores de sangue saudáveis foram analisadas quanto a presença de IgG anti-EBV para um estudo de soroprevalência (SMATTI et al., 2017). A pesquisa identificou uma alta soroprevalência (97,9%) e, também, constatou uma maior prevalência do tipo 1 do EBV (72,5%), comparado ao genótipo 2 (4,1%). Observou que havia significância entre a positividade da infecção por EBV e o aumento da idade dos participantes da pesquisa.

### **2.7.2. Epidemiologia da infecção por EBV no Brasil**

A infecção por EBV está ligada a uma alta prevalência mundial e doenças de alta morbidade. Estudos buscam entender melhor a epidemiologia e biologia desse herpesvírus. Todavia, no Brasil, há uma carência de estudos atuais e voltados a entender esses fatores no país.

Apesar de antigos, estudos realizados por Black e colaboradores (1970 e 1974) com tribos indígenas isoladas na Amazônia mostram a grande abrangência da infecção pelo EBV ao atingir regiões mais isoladas do Brasil. Em questão, o trabalho mostrou uma alta prevalência de infecção por herpesvírus, dentre eles o Epstein-Barr, em tribos como os Tiriyo e Kayapós. Essa pesquisa reforçou a ideia que o EBV possui grande abrangência, a ponto de infectar humanos de regiões isoladas do mundo.

Em São Paulo, um estudo observou diferentes porcentagens de positividade para anti-EBV em distintos grupos etários (CARVALHO et al., 1973; PANNUTI, 1981). Crianças de 0 a 9 anos apresentaram uma média de soropositividade de 41,6%, no qual a faixa etária de 6-9 anos apresentou uma maior porcentagem, 69,2%. Entre indivíduos com idade de 15 a 40 a porcentagem média de positividade foi 87,5%, não havendo distinção entre a soropositividade entre esses grupos etários. Outro estudo realizado na cidade de São Paulo também avaliou a prevalência de anticorpos do EBV em indivíduos saudáveis e pacientes com AIDS (KUSCHNAROFF et al., 2007). Para o grupo de saudáveis, foi encontrada uma prevalência de 94,4%, enquanto que para o grupo com AIDS houve uma prevalência de 100%.

Um estudo realizado em Vitória, Espírito Santo, observou uma prevalência de 74% para infecção por EBV em amostras de crianças e adolescentes de 1 a 21 anos (FIGUEIRA-SILVA; PEREIRA, 2004). A maior soropositividade para a infecção ocorreu em crianças maiores de 10 anos, de baixa renda e baixa escolaridade materna. Os dados associam, novamente, a infecção por EBV a fatores de susceptibilidade citados anteriormente.

## **2.8. Principais doenças associadas à infecção por EBV**

A infecção por EBV está associada a diversas doenças de alta morbidade em humanos. Linfoma de Burkitt, mononucleose infecciosa e linfoma de Hodgkin são os exemplos principais.

O linfoma de Burkitt foi a primeira manifestação clínica associada à infecção por EBV. Ele foi descoberto por Denis Burkitt em 1958 na região de Uganda. A ligação entre o vírus e a doença foi evidenciada por meio de identificação de partículas virais em células infectadas do linfoma por Michel Epstein, Yvonne Barr e colaboradores

(EPSTEIN, 1965). A doença está presente principalmente em regiões como EUA, Europa e África, porém esta última apresenta maior prevalência, cerca de 97% (IARC, 1997).

Ao que tudo indica, a evolução da doença ocorre devido a translocação gênica do proto-oncogene, que é expresso em altas taxas no linfoma e o EBV está relacionado como um dos fatores para essa desordem (BRADY; MACARTHUR; FARRELL, 2007; MARINKOVIC et al., 2004). c-Myc está ligado a expressão de genes relacionados a proliferação celular, diferenciação de apoptose, assim sua transcrição desregulada leva à processos tumorigênicos como o LB (MARINKOVIC et al., 2004).

A manifestação clínica do linfoma de Burkitt varia de acordo com a faixa etária e o gênero do indivíduo, deste modo é classificado em linfoma endêmico e não endêmico (NEPARIDZE; LACY, 2014). O linfoma endêmico acomete crianças de 2 a 16 anos, idade média de 7 anos e ocorre na região da mandíbula. O tipo não endêmico atinge pessoas com cerca de 35 anos. No entanto, ambos os tipos são mais frequentes em indivíduos do sexo masculino (BRADY; MACARTHUR; FARRELL, 2007; NEPARIDZE; LACY, 2014). De modo geral, os sintomas apresentados pela doença são: inchaço da mandíbula e maxila, afrouxamento molar e pré-molar em crianças, tumores intra-abdominais, alargamento de glândulas parótidas, seios, testículos, tireoide ou até rins, dentre outros (BRADY; MACARTHUR; FARRELL, 2007).

Apesar da forte associação do linfoma de Burkitt com o EBV, é importante ressaltar que existem três formas de adquirir a doença: forma esporádica, a mais comum adquirida pela infecção por EBV; endêmica, através da infecção por malária; e imunodeficiência associada, que ocorre por meio da infecção por HIV (BRADY; MACARTHUR; FARRELL, 2007; NEPARIDZE; LACY, 2014).

A mononucleose infecciosa (MI) é a principal doença relacionada à infecção por EBV. É conhecida como “doença do beijo” devido sua forma mais comum de transmissão ser a saliva (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A doença é mais comum entre jovens de 15 a 20 anos e de países desenvolvidos, tais como EUA, países europeus, Canadá, Nova Zelândia e Austrália (OLIVEIRA et al., 2012; SIMON; MUNGER; ASCHERIO, 2011).

Os sintomas para MI são: febre (cerca de 87% dos casos), inflamação do anel linfático de Waldeyer, úvula e palato com aspecto gelatinoso, inchaço dos linfonodos

cervicais é o sintoma mais típico da doença, edema de pálpebras, dentre outras (OLIVEIRA et al., 2012).

Não há tratamento específico para a doença (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). Os sintomas são geralmente tratáveis com analgésicos para dores de garganta, medicamentos para febre e o aciclovir que combate o vírus. Corticoides são usados apenas em casos mais graves, pois seu uso contínuo aumenta a susceptibilidade a infecções secundárias (NAKAOKA et al., 2013).

O linfoma de Hodgkin foi descoberto em 1832 pelo pesquisador Thomas Hodgkin que o classificou como uma neoplasia linfoproliferativa (HODGKIN, 1832). Em 1991, Weiss e colaboradores associaram a infecção por EBV ao linfoma por meio da detecção do genoma viral em 12 de 23 casos estudados e de viral em 11 de 23 casos (WEISS et al., 1991). Em populações ocidentais o EBV foi identificado em tecidos tumorais de LH em torno de 40-50% dos casos. Também, o fato de que pessoas que tiveram mononucleose infecciosa apresentarem um risco de 4 vezes de obterem o LH, reforçam a associação da infecção por EBV na doença (IARC, 1997).

O linfoma de Hodgkin tem células características chamadas *Reed-Stenberg* que apresentam grande tamanho, são bilobadas, proeminente nucléolos e localizadas entre linfócitos e células inflamatórias, facilitando o diagnóstico da doença através de biopsia (PILERI et al., 2002). Outro fato importante é que um modelo de idade bimodal para a distribuição da doença pela infecção por EBV demonstrou que crianças abaixo de 15 anos e grupos de idosos são os mais suscetíveis a serem acometidos (FLAVELL; MURRAY, 2000).

## **2.9. Diagnóstico do EBV**

Diversas técnicas são utilizadas para a detecção do EBV, principalmente para espécimes tumorais e neoplásicos causados pela infecção do vírus. Essas técnicas utilizam diferentes biomarcadores para identificação da infecção, como, por exemplo, as sorológicas, que captam anticorpos para o vírus, e moleculares, que identificação o DNA viral (ANTONIO; RABENHORST, 2006).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é a técnica sorológica mais utilizada para detecção de infecções virais (GÄRTNER et al., 2003). Ela consiste na captação de anticorpos anti-EBV e a identificação desses determinados anticorpos é um indicativo para o grau de infecção viral do indivíduo, no qual IgM anti-EBV é uma infecção primária e IgG anti-EBV para infecção aguda (GOH et al., 2017; ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). No entanto, é necessário realizar o teste de avidéz para IgG, pois este anticorpo é pouco ávido até 4 meses após a infecção por EBV, podendo gerar um resultado falso-positivo para infecção tardia (DE PASCHALE; CLERICI, 2012)

O ensaio de imunofluorescência indireta é uma técnica sorológica muito eficaz na detecção de anti-EBV (GOH et al., 2017). O diagnóstico da infecção também é realizado através da detecção de imunoglobulinas IgM e IgG produzidas por anticorpos heterofilos contra o antígeno do capsídeo viral (VCA). Já Western blot, segundo Hess (2004), também possibilita o diagnóstico através da detecção de anticorpos específicos para variados antígenos do EBV.

Para pacientes com suspeita de mononucleose infecciosa, o teste quantitativo de Paul-Bunnell-Davidsohn é o mais utilizado para diagnóstico. Assim como as técnicas de imunofluorescência indireta e western blot, o diagnóstico é realizado através da detecção IgM ou IgG (OLIVEIRA et al., 2012). Esses anticorpos estão presentes em até 90% de pacientes jovens e adultos, e de 40-50% em crianças (NAKAOKA et al., 2013; SIMON; MUNGER; ASCHERIO, 2011).

A técnica de PCR é um método molecular utilizado de forma rotineira em laboratórios para detecção e quantificação de material genético do EBV a partir de fluidos corporais, como sangue total ou plasma, ou de amostras de tecidos (HUH et al., 2017; MUDERRIS et al., 2013; ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). Além disso, esta técnica possibilita a determinação dos genótipos do EBV, se EBV-1 ou EBV-2, através dos métodos de qPCR ou Nested-PCR (MUDERRIS et al., 2013). No entanto, diferenças quanto quantificação nos ensaios de carga viral foram observadas dentre alguns laboratórios (HAYDEN et al., 2012). Como solução, a Organização Mundial da Saúde determinou um padrão internacional para a sensibilidade, linearidade e o fator de conversão ao utilizar amostra de sangue total (FRYER et al., 2016).

A hibridização *in situ* também é bastante utilizada e eficaz para a detecção do EBV. Essa técnica utiliza sondas específicas para EBERs, devido este ser um componente viral de alta expressão e se localizar em diversos tecidos, no qual possibilita identificar células infectadas por EBV através de um contexto histo ou citopatológico (ANTONIO; RABENHORST, 2006; IARC, 1997).

Southern Blot também é um método utilizado para o diagnóstico da infecção por EBV. De acordo com Ambinder e Mann (1994), Southern blot consiste na caracterização de células infectadas pelo vírus em sua forma latente e possibilita a detecção da integração viral no genoma do hospedeiro.

## **2.10. Tratamento**

A infecção por EBV tem como tratamento principal a utilização de fármacos nucleosídicos (GERSHBURG; PAGANO, 2005). Ensaios clínicos mostram que esses medicamentos agem inibindo a replicação viral, pois são anabolizadas intracelularmente à forma ativa de nucleosídeo trifosfato e, em seguida, atuam como substratos danificados na polimerização do material genético, assim, interrompem a síntese de DNA do vírus (GERSHBURG; PAGANO, 2005; WOOD; BALFOUR, 1999). Os fármacos mais citados pela literatura são: aciclovir, valaciclovir, ganciclovir (valgaciclovir).

Atualmente, o aciclovir veio a ser substituído por sua versão mais eficaz, o valaciclovir, que no organismo é convertido para aciclovir pela enzima hidrolase e apresenta biodisponibilidade até 5 vezes mais que o seu antecessor (HOSHINO et al., 2009; WOOD; BALFOUR, 1999). Em seu estudo, Hoshino e colaboradores (2009) observaram que o valaciclovir reduzia a quantidade de células B infectadas por EBV e indicou que o uso prolongado deste medicamento pode eliminar o vírus do organismo humano na ausência da reativação viral. Outros estudos também confirmam a eficácia do valaciclovir no tratamento da infecção por EBV (IRA, 2012; VEZINA *et al.*, 2010).

A combinação de determinados fármacos como ciclofosfamida, rituximab, dexorrubicina e prednisolona, vincristina ou metotrexato, vincristina e procarbaniza, é outro método terapêutico antiviral bastante utilizado (KURIYAMA et al., 2014; LAMAR et al., 2016). Porém algumas doenças relacionadas ao EBV inexistem tratamento

específico e são tratadas sintomaticamente. Por exemplo, a mononucleose infecciosa, no qual o paciente é tratado com analgésicos para a dor de garganta, ingestão de muita água devido a febre, descansos prolongados, dentre outros (NAKAOKA et al., 2013; ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011).

Para uma possível vacina profilática, estudos revelam que a glicoproteína gp350 do EBV é uma forte candidata como imunógeno, visto que esta proteína auxilia na entrada do vírus nas células hospedeiras e principal alvo de anticorpos neutralizantes (WEISS *et al.*, 2017). Entretanto, para produção de tal vacina ainda é necessário solucionar problemas como os potenciais efeitos oncogênicos da introdução de DNA/RNA do EBV em pacientes, a produção limitada e liberação de partículas virais utilizadas na vacina, entre outros (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011; WEISS et al., 2017).

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Estimar a soroprevalência e descrever a infecção pelo vírus Epstein-Barr em Manaus e Presidente Figueiredo.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Estimar a soroprevalência do EBV em residentes de Manaus e Presidente Figueiredo;
- Identificar as possíveis características sociodemográficas e fatores de riscos relacionados à infecção pelo EBV;
- Avaliar a relação entre os níveis séricos de IgG anti-EBV e os fatores sociodemográficos da população estudada.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Modelo de Estudo**

Estudo transversal originado de um inquérito de base populacional previamente realizado.

### **4.2. Comitê de Ética**

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob número CAAE 42203615.4.0000.5020, por meio de parecer 974.428 de 04/03/2015 (**Anexo**)

### **4.3. População de Estudo**

Os indivíduos participantes da pesquisa foram indivíduos de 1 a 81 anos de idade, de ambos os sexos, cor e raça, moradores da cidade de Manaus e Presidente Figueiredo.

#### **4.3.1. População de Manaus**

Os participantes de Manaus foram convidados de forma aleatória e voluntária a participar da pesquisa aplicada no segundo trimestre de 2015 e concordaram na coleta de material biológico. O questionário continha dados de características socioeconômicas, qualidade de vida, fatores comportamentais, histórico de doenças, acesso e gasto com insumos e serviços de saúde e condições de habitação e saneamento. Dos 4.000 (quatro mil) participantes, 77% deles informaram que gostariam de participar da segunda fase da pesquisa que envolve a coleta de material biológico para realização de exames laboratoriais. O projeto em questão faz parte de um segundo momento de estudo que já foi finalizado, que consistiu em verificar aspectos ambientais, socioeconômicos, agravos em saúde e qualidade de vida.

Os indivíduos da pesquisa foram contatados por meio de ligação telefônica para se pronunciarem quanto ao real interesse em aprofundar a pesquisa com a coleta de sangue periférico para realização de exames laboratoriais hematológicos, bioquímicos e imunológicos.

#### **4.3.2. População de Presidente Figueiredo**

Quanto aos participantes de Presidente Figueiredo, estes eram pacientes atendidos em postos de saúde da cidade e que foram convidados a participar da pesquisa. Os procedimentos quanto a coleta de amostras só foi realizada após assinatura do TCLE e preenchimento do questionário epidemiológico, assim como os participantes de Manaus.

#### **4.4. Critérios de Inclusão**

Foram elegíveis indivíduos residentes da cidade de Manaus e Presidente Figueiredo que aceitaram participar da pesquisa, coleta de material biológico e que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice**).

#### **4.5. Critérios de Exclusão**

Foram excluídos indivíduos que desistiram da pesquisa e aqueles que apresentaram amostras inadequadas para as análises, com doenças crônicas e agudas ou que não permitiram coleta de novas amostras.

#### **4.6. Obtenção de amostras biológicas**

A coleta de material biológico teve início em dezembro de 2015. Os participantes de Manaus tiveram uma visita agendada em seu domicílio para o preenchimento do TCLE, instruções quanto ao objetivo da pesquisa, coleta do material biológico e

perguntas quanto ao inquérito epidemiológico. Quanto o procedimento para participantes de Presidente Figueiredo, este foi realizado no posto de saúde local com todo procedimento de coleta de dados similares aos descritos anteriormente para participantes de Manaus.

Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Virologia e Imunologia do INPA para processamento e armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior uso nas análises de ensaio imunoenzimático (ELISA).

#### **4.8. Diagnóstico sorológico da infecção por EBV**

O plasma ou soro dos indivíduos foram testados para a presença de IgG anti-EBV (IgG anti-VCA, IgG anti-EBNA1 e IgG anti-EA) por meio de um ensaio imunoenzimático, realizado de acordo com as informações do fabricante (*Serion ELISA classic, Serion GmbH, Germany*). Em resumo, as amostras de soro juntamente com os controles foram adicionadas em uma microplaca de 96 micropoços revestidos com antígenos provenientes do EBV. Após um período de incubação de 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , a placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem para que houvesse a eliminação dos anticorpos inespecíficos que não se ligaram aos antígenos virais presentes na placa. Em seguida, será adicionado um conjugado composto por um anti-IgG ligado a enzima peroxidase, e novamente a placa foi incubada por mais 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Após esse período, foi adicionado o substrato (peróxido de hidrogênio-TMB) a placa, que foi mais uma vez incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Depois, adicionou-se a solução de parada e a densidade ótica (DO) resultante do teste foi medida em espectrofotômetro utilizando um filtro de 405nm. A positividade do teste foi determinada de acordo com a fórmula *cut-off* indicada pelo fabricante.

#### **4.9. Variáveis**

As variáveis utilizadas para associar a infecção por EBV foram: sexo (masculino/feminino), faixa etária, cidade (Manaus/Presidente Figueiredo), grau de instrução (não estuda, sem instrução, ensino fundamental, ensino médio e ensino superior) e anemia.

#### **4.10. Análise dos dados**

Foi obtida estatística descritiva de todas as características sócio demográficas obtidas, no qual será calculada medidas de tendência central (média, moda, mediana) e de dispersão (desvio padrão, variância, erro padrão). Para identificar os fatores relacionados à susceptibilidade a infecção por EBV, foi empregado análise bivariada e como medida de efeito a razão de prevalência.

Foi realizada a estimativa de regressão logística para a presença de IgG anti-EBV e regressão linear considerando como desfecho o valor de absorbância de IgG (nível sérico) com a idade. Para a correlação entre níveis séricos de IgG anti-EBV com as variáveis sexo e anemia foi utilizado o teste de Mann-Whitney U. Quanto a correlação entre o nível sérico de IgG anti-EBV com a variável grau de instrução, usou-se o teste de Kruskal-Wallis. Todas as análises estatísticas forma realizadas por meio do programa STATA 14.2 e Prism 5.0v. Em todas as análises foi considerado significativo os resultados que obtiveram valor de  $p < 0,05$ .

#### **4.11. Garantias éticas**

Asseguramos ao participante da pesquisa confidencialidade, bem como o direito de recusar-se a responder as perguntas que ocasionem constrangimento de qualquer natureza. Todas as informações geradas pelo presente estudo foram conduzidas no mais absoluto sigilo e os pacientes tiveram acesso aos dados gerados pelo estudo sempre que desejarem.

#### **4.12. Riscos e benefícios**

Os riscos para os participantes da pesquisa foram considerados mínimos, uma vez que os mesmos foram apenas submetidos a coleta de sangue e a uma entrevista onde foram coletados dados sociodemográficos.

Caso o paciente estivesse constrangido a responder alguma pergunta do questionário epidemiológico, o mesmo podia declinar de responder qualquer pergunta

que o deixasse desconfortável. As informações coletadas auxiliaram o esclarecimento em relação a morbidade, patogenia e os principais comportamentos de risco associados à infecção por EBV.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Soroprevalência para infecção por EBV

Foram analisadas um total de 579 amostras de soro de residentes da cidade de Manaus e de Presidente Figueiredo quanto a presença de IgG (anti-VCA, anti-EBNA1 e anti-EA), por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA). Destas, 534 apresentaram soropositividade para a infecção por EBV, enquanto que 45 foram soronegativas. A soroprevalência total verificada entre os participantes do estudo foi de 92,23% (**Tabela 2**).

**Tabela 2. Soroprevalência da infecção pelo EBV em residentes de Manaus e Presidente Figueiredo**

<b>Anti-EBV (IgG)</b>	<b>N</b>	<b>Total (%)</b>
<b>Soropositivos</b>	534	92,23
<b>Soronegativos</b>	45	7,77
<b>Total</b>	579	100,00

Os dados de soropositividade para infecção por EBV também foram estratificadas quanto ao local de origem das amostras (**Tabela 3**). A prevalência observada foi maior entre os indivíduos residentes de Manaus (96,32%) em relação aos indivíduos residentes de Presidente Figueiredo (90,97%), o que sugere que a população de Manaus está mais susceptível a infecção por EBV ( $p=0,041$ )

**Tabela 3. Soroprevalência da infecção por EBV quanto a cidade origem das amostras dos participantes**

<b>Cidade</b>	<b>N (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>p</b>
<b>Manaus</b>	136 (23,49)	131 (96,32)	5 (3,68)	0,041
<b>Presidente Figueiredo</b>	443 (76,51)	403 (90,97)	40 (9,03)	
<b>Total</b>	579	534	45	-

Ao analisarmos a prevalência do EBV de acordo com o sexo dos indivíduos estudados, foi verificado que a soroprevalência entre mulheres (94,13%) foi ligeiramente maior em comparação a observada entre homens (89,14%), sendo que das 358 amostras de soro de mulheres analisadas, 21 (5,87%) foram soronegativas, enquanto que entre homens foi observada soronegatividade em 24 amostras (10,86%) de um total de 221 amostras (**Tabela 4**). Este dado sugere que mulheres residentes de Manaus e de Presidente Figueiredo estão mais susceptíveis a infecção por EBV em comparação aos homens ( $p=0,029$ ).

**Tabela 4. Soroprevalência da infecção por EBV em de acordo com o sexo dos participantes**

<b>Sexo</b>	<b>N (%)</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>p</b>
<b>Feminino</b>	358 (61,83)	337 (94,13)	21 (5,87)	0,029
<b>Masculino</b>	221 (38,17)	197 (89,14)	24 (10,86)	
<b>Total</b>	579	534	45	

Ao se avaliar a soroprevalência do EBV de acordo com a idade dos participantes da pesquisa (**Tabela 5**), foi verificada maior soroprevalência entre indivíduos que se encontram na faixa etária de 20 a 29 anos (95,73%), seguida por aqueles que estão entre 50 e 59 anos (95,65%). A menor soroprevalência observada foi entre os indivíduos com idades de 1 a 10 anos (77,19%). Os resultados sugerem que indivíduos entre 20 a 29 anos são mais susceptíveis a infecção pelo EBV ( $p=0,024$ ).

**Tabela 5. Soroprevalência da infecção por EBV de acordo com a Idade.**

<b>Idade</b>	<b>N*</b>	<b>IgG EVB Positivo</b>	<b>*%</b>	<b>p</b>
<b>1-10</b>	57	44	77,19	0,024
<b>11-19</b>	69	63	91,34	
<b>20-29</b>	117	112	95,73	
<b>30-39</b>	112	106	94,64	
<b>40-49</b>	68	62	91,18	
<b>50-59</b>	69	66	95,65	
<b>≥60</b>	77	71	92,20	

\*Número total de participantes que informaram a idade (N=569).

Ao analisarmos a variável grau de instrução em relação ao número de participantes que informaram sua escolaridade (N=531), foi verificado que a maior percentagem de infectados por EBV estão entre aqueles com ensino superior (100%), seguido de indivíduos com ensino médio (94,67%) e ensino fundamental (90,08) (**Tabela 6**). A menor soroprevalência foi observada entre participantes que não estudam (72,72%), que compreende a crianças que não se encontram no período escolar. Este resultado sugere que pessoas com nível superior são mais sujeitas a infecção pelo EBV (p=0,001).

**Tabela 6. Soroprevalência da infecção por EBV de acordo com o grau de instrução.**

<b>Grau de instrução</b>	<b>N*</b>	<b>IgG EBV Positivo</b>	<b>%</b>	<b>p</b>
<b>Não estuda**</b>	22	16	72,72	0,001
<b>Sem instrução</b>	45	40	88,89	
<b>Ensino Fundamental</b>	131	118	90,08	
<b>Ensino Médio</b>	319	302	94,67	
<b>Ensino Superior</b>	14	14	100%	

\*Número total de participantes que informaram a escolaridade (N=531). \*\*\*Crianças que ainda não se encontram no período escolar.

Indivíduos com anemia também foram incluídos na análise quanto a infecção por EBV (**Tabela 7**). A soropositividade para EBV dos participantes da pesquisa que não possuíam anemia foi maior (92,71%) em comparação àqueles portadores de anemia (90,91%), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,476$ ).

**Tabela 7. Soroprevalência da infecção por EBV de acordo com indivíduos com anemia.**

<b>Anemia</b>	<b>N</b>	<b>Positivos (%)</b>	<b>Negativos (%)</b>	<b>p</b>
<b>Anemia</b>	154	140 (90,91)	14 (9,09)	0,476
<b>Sem Anemia</b>	425	394 (92,71)	31 (7,29)	
<b>Total</b>	579	534	45	

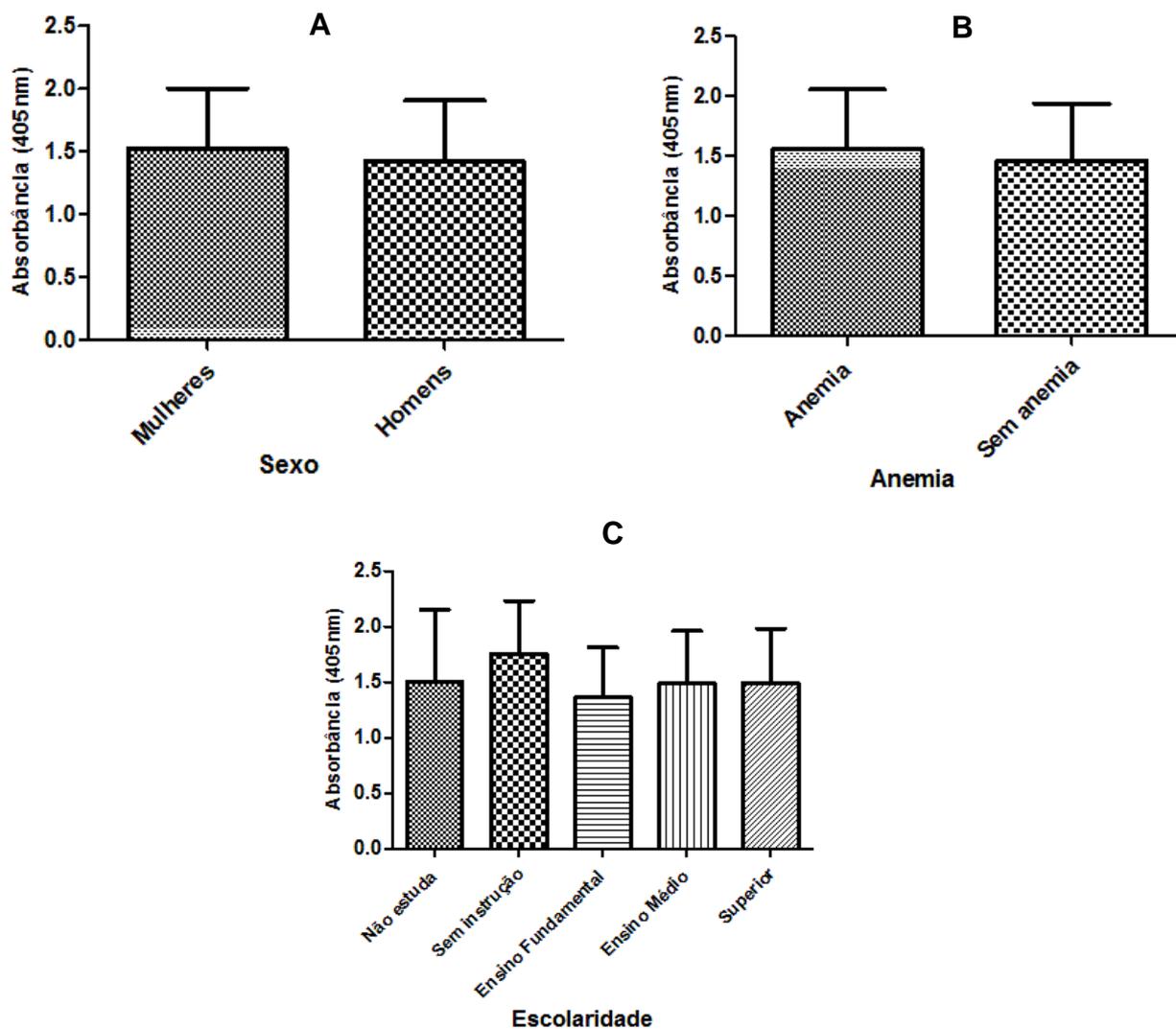
## 5.2. Níveis séricos de IgG anti-EBV

No intuito de verificar os possíveis fatores associados aos níveis séricos de IgG verificados nos indivíduos, este estudo analisou os valores de absorvância de IgG de acordo com alguns fatores sociodemográficos da população estudada.

Ao se avaliar os níveis séricos de IgG observados de acordo com o sexo, mulheres apresentaram níveis mais alto de IgG (média de OD=1.526) comparado a homens (média de OD=1.425) (**Figura 3.A**), com significância quanto a associação ( $p=0,023$ ).

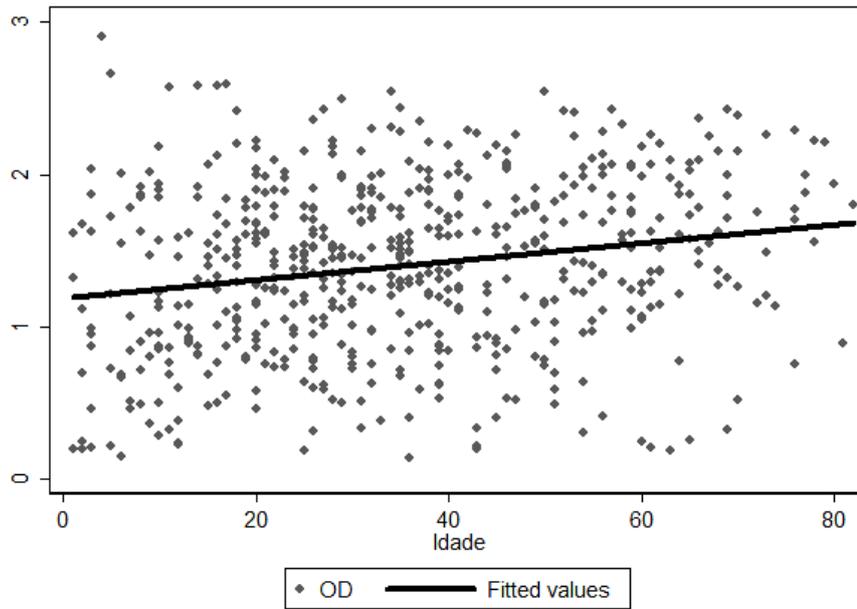
Em relação a variável anemia, os dados demonstram que participantes da pesquisa com anemia apresentam valores séricos de IgG ligeiramente maiores (média de OD=1.554) que indivíduos sem anemia (média de OD=1.465), com significância estatística ( $p<0,001$ ) (**Figura 3.B**).

Quanto ao grau de instrução, verificou-se que os títulos de IgG foram maiores em indivíduos sem instrução (média de OD=1.751), com associação significativa ( $p=0,001$ ) (**Figura 3.C**). Também, pode ser observado que indivíduos com curso superior também apresentaram níveis altos de IgG sérica (média de OD=1.493). Contudo, devido a um número amostral pequeno ( $n=14$ ), não é possível avaliar a influência deste fator sobre os títulos de IgG sérico observados. Indivíduos que não estudam apresentaram os níveis mais baixos de IgG sérico (média de OD=1.160), porém esses indivíduos correspondem a crianças que ainda não estão em idade escolar (1 a 5 anos).



**Figura 3.** Níveis séricos de IgG de acordo com fatores sociodemográficos (450nm) (A) Gênero versus níveis de IgG sérico; (B) Anemia versus níveis séricos; (C) Grau de instrução versus níveis de IgG sérico.

Ao se avaliar os níveis de séricos de IgG dos participantes deste estudo com base na absorbância detectada em cada amostra (450nm) por regressão linear, foi evidenciada uma correlação entre altos níveis de IgG com o aumento da idade ( $p < 0,001$ ), no qual indivíduos maiores de 60 anos apresentaram alto nível sérico de IgG (**Figura 4**).



**Figura 4.** Valores de séricos de IgG através de absorvância (450nm) em relação a idade dos participantes.  $p < 0,001$

## **6. DISCUSSÃO**

### **6.1. Resultados principais**

O EBV é um herpesvírus que apresenta alta prevalência, infectando cerca de 95% da população mundial (BALFOUR et al., 2015). A susceptibilidade para essa infecção está relacionada a fatores como geografia, ambiente, economia e demografia. Na maioria dos casos, a infecção primária pelo EBV é assintomática na infância, porém o vírus possui grande importância clínica por estar relacionado ao acometimento de diversas doenças humanas de alta morbidade e difícil tratamento, como, por exemplo, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin e mononucleose infecciosa (ODUMADE; HOGQUIST; BALFOUR, 2011). No entanto, a infecção pelo EBV ainda é bastante negligenciada no Brasil e poucos estudos são produzidos acerca da epidemiologia do mesmo, principalmente na região Norte do país. Deste modo, esta pesquisa possui importância em nível de vigilância em saúde para a região, pois busca entender a soroprevalência e os fatores de susceptibilidade associados à infecção pelo EBV.

Neste estudo foi verificada uma prevalência total de 92,23% para residentes de Manaus e de Presidente Figueiredo, sendo que em Manaus a prevalência observada foi de 96,32%, o que sugere maior susceptibilidade à infecção por EBV em residentes da cidade de Manaus ( $p=0,041$ ). Estas prevalências são similares às observadas em outras populações de países em desenvolvimento. Em um estudo realizado na província de Elazig, Turquia, com participantes de 0 a maiores de 60 anos e de ambos os sexos, foi observada uma prevalência de 99,4% para infecção por EBV (OZKAN et al., 2003). Outro estudo realizado em Qatar verificou uma prevalência de 97,9% entre 673 doadores de sangue com idades entre 18 a 70 anos (SMATTI et al., 2017).

No Brasil, os estudos relacionados a soroprevalência por EBV são escassos e desatualizados, principalmente na região Norte. No entanto, trabalhos mais antigos demonstram uma menor soroprevalência para infecção por EBV quando comparados ao presente estudo. Em Belém do Pará, Monteiro e colaboradores (1998) analisaram amostras de soro de pacientes de um ambulatório local e verificaram uma soroprevalência de 72,5% para IgG anti-EBV. Já na cidade de Vitória, Espírito Santo,

foi observada uma soroprevalência de 74% para EBV em crianças e adolescentes entre 1 a 21 anos (FIGUEIRA-SILVA; PEREIRA, 2004).

A alta prevalência observada neste estudo, principalmente na cidade de Manaus, pode ser explicado devido ao fato de que, geralmente, regiões em desenvolvimento ou grandes centros urbanos, apresentam maior soroprevalência pelo EBV (OZKAN et al., 2003; SMATTI et al., 2017b; SUNTORNLOHANAKUL et al., 2015). Isto pode ocorrer, em parte, devido a fatores como condições de superpopulação, falta de saneamento básico adequado e escassez de informações acerca da infecção por herpesvírus, propiciando a alta transmissão pelo EBV (ALEBOUYEH et al., 1984; SUNTORNLOHANAKUL et al., 2015).

Este estudo observou maior soropositividade para EBV em mulheres (94,13%) do que em homens (89,14%), sugerindo que mulheres são mais suscetíveis infecção pelo EBV comparado aos homens ( $p=0,029$ ) nas regiões estudadas. Diferente de nossos dados, alguns estudos não mostram que a infecção por EBV está diretamente relacionada ao sexo, apesar de algumas vezes evidenciar prevalência aumentada em mulheres, porém sem significância estatística (BALFOUR et al., 2013; CHEN et al., 2015; HAQUE et al., 1996; SMATTI et al., 2017). SMATTI e colaboradores (2017) em um estudo realizado em Qatar, demonstraram que a soroprevalência para infecção pelo EBV foi maior entre indivíduos do sexo feminino (100%) em comparação aos indivíduos do sexo masculino (97,9%) em doadores de sangue, porém sem significância estatística ( $p=0,581$ ). Da mesma forma, Chen e colaboradores (2015) analisaram a soroprevalência para EBV em homens e mulheres com idade de 1 a maiores de 60 anos, residentes de 16 municípios de Taiwan, no entanto não observaram associação estatisticamente significativa entre o sexo dos indivíduos e a infecção por EBV ( $p=0,369$ ).

Embora os estudos citados não tenham observado significância estatística entre a infecção pelo EBV e o sexo dos indivíduos estudados, Crawford e colaboradores (2002), investigaram 1006 alunos da Universidade de Edimburgo, Reino Unido, com idade entre 18 e 21 anos e observaram uma soroprevalência maior entre mulheres (79,2%) do que em homens (67,4%) com significância estatística ( $p<0,001$ ). O estudo em questão ainda sugeriu que mulheres que possuíam múltiplos parceiros eram mais suscetíveis à infecção pelo EBV do que mulheres com parceiro fixo ( $p=0,001$ ).

Além na transmissão via saliva, o EBV já foi encontrado subclínicamente no trato genital de homens e mulheres (NAHER et al., 1992). Estudos no Brasil mostram que mulheres sexualmente ativas representam um grupo de risco para determinadas infecções (PAULA et al., 2015). Todavia, a variável de múltiplos parceiros não foi analisada no presente estudo, impossibilitando associar a susceptibilidade da infecção por EBV ao comportamento sexual da população estudada.

Quanto à soropositividade da infecção por EBV de acordo com a faixa etária dos participantes, foi observado que adultos acima de 20 anos de idade apresentaram maior soroprevalência (média de 93,88%) comparado a crianças e adolescentes de 1 a 19 anos (média de 84,26). Esses dados sugerem que a soroprevalência a infecção por EBV está associado com a idade ( $p=0,024$ ), dados semelhantes aos observados por outros estudos (SMATTI et al., 2017; SUNTORNLOHANAKUL et al., 2015). Haque e colaboradores (1996) analisaram 502 amostras de soro de um grupo de pessoas com idade entre 15 dias e 90 anos em Bangladesh. Os pesquisadores identificaram um grande número de infecção primária em crianças de 2 a 10 anos (69,65%) e em indivíduos acima de 25 anos (87,8%). Outro estudo realizado com 538 amostras de soro de indivíduos com idades entre 6 meses a maiores de 40 anos residentes da província de Khon Kaen, Tailândia, também constatou que o aumento da soroprevalência pelo EBV estava diretamente relacionado ao fator idade, visto que os indivíduos mais velhos apresentaram maior soroprevalência ( $p<0,05$ ), enquanto que crianças de 6 a 8 anos de idade apresentaram maiores valores de incidência para a infecção por EBV (SUNTORNLOHANAKUL et al., 2015).

Em países em desenvolvimento, estudos apontam que a infecção primária por EBV ocorre na faixa dos 5 anos de idade e aumenta exponencialmente de acordo com a idade, diferente do que ocorre em países desenvolvidos (ALEBOUYEH et al., 1984; FOURCADE et al., 2017; TAKEUCHI et al., 2006). Adultos acima de 20 anos estão entre os grupos de risco para infecção por EBV, como relatado por alguns estudos, pois estão expostos a fatores que favorecem a transmissão por EBV, como contato com saliva infectada por meio do beijo, e por relações sexuais (CRAWFORD et al., 2002, 2006; NAHER et al., 1992). Como dito anteriormente, o fator comportamento sexual poderia ter sido analisado neste estudo através do inquérito epidemiológico, com a finalidade de analisar de forma mais ampla quais fatores poderiam estar relacionados a maior prevalência por EBV em adultos com idade entre 20 e 29 anos.

De acordo com este estudo, indivíduos com ensino superior são mais susceptíveis a infecção por EBV ( $p=0,001$ ), visto que os participantes que tinham ensino superior apresentaram maior prevalência (100%), seguido daqueles com ensino médio (94,67%). Esses dados corroboram com resultados encontrados por Chen e colaboradores (2015), que analisaram 1411 amostras de soro de residentes de Taiwan e observaram que participantes com nível superior tinham maior soropositividade para EBV. Entretanto, diferente dos dados aqui apresentados, a maioria dos estudos associam a infecção por EBV a indivíduos com menor grau de instrução ou filhos de pais com baixo grau de instrução (DELANEY; THOMAS; BALFOUR, 2015; FIGUEIRA-SILVA; PEREIRA, 2004). Embora os resultados demonstrem maior prevalência no grupo com ensino superior, uma amostra maior do que a utilizada pelo presente estudo ( $N=14$ ) deve ser analisada, a fim de confirmar a alta positividade para infecção por EBV nesses indivíduos.

O comportamento sexual entre jovens universitários já foi relatado como fator de risco para infecção pelo EBV por alguns estudos (CRAWFORD et al., 2002, 2006). Como citado anteriormente, além da transmissão via oral, o EBV também pode ser transmitido por via sexual (NAHER et al., 1992). Quanto a baixa escolaridade, esta remete, na maioria dos casos, a pessoas com baixo poder econômico, fator este que também está ligado à susceptibilidade à infecção pelo EBV (OZKAN et al., 2003). Famílias com baixo poder aquisitivo de países em desenvolvimento possuem um número alto de integrantes, o que possibilita um maior compartilhamento de materiais contaminados entre os mesmos como, por exemplo, copos e talheres, propiciando um fator de risco para a infecção pelo EBV, de acordo com alguns estudos (SUNTORNLOHANAKUL et al., 2015, STANCIU; MIHĂILESCU, 2014).

No presente estudo, a prevalência do EBV também foi avaliada em participantes que apresentaram anemia. Alguns relatos de caso associam a infecção por EBV a pacientes com algum tipo de anemia (HAMILTON et al., 2015; KHAN, 2012; LAU et al., 1994). Este estudo não verificou a relação como fator predisponente a infecção por EBV, pois indivíduos sem anemia apresentaram prevalência de 92,71% para EBV, enquanto que a prevalência observada em indivíduos com anemia foi de 90,91% ( $p=0,476$ ). Todavia, é importante ressaltar que mais estudos com maior  $N$  amostral são necessários para verificar esta possível correlação.

Neste estudo foram realizadas também análises quanto aos níveis séricos de IgG anti-EBV com relação à escolaridade, sexo, faixa etária e anemia. Esta análise é relevante, visto que o nível sérico de anticorpos IgG contra específicas proteínas do EBV (EBNA1, VCA, EA) já foram associados ao risco de desenvolvimento de neoplasias como linfoma de Hodgkin, uma vez que já foi evidenciado altos níveis sérico de IgG anti-EBV em indivíduos portadores desta neoplasia (COGHILL; HILDESHEIM, 2014; EVANS; GUTENSOHN, 1984).

Quando associado ao sexo, observou-se que mulheres apresentam altos níveis de IgG, com média de OD=1.526, comparado aos homens, com média de OD=1.425, estatisticamente significativa ( $p=0,023$ ). Porém, não há estudos que relacionem o alto nível sérico de IgG anti-EBV com o sexo. No entanto, outras pesquisas mostram que mulheres diferem de homens em relação a resposta imune, como maior produção de anticorpos e citocinas. Tais respostas elevadas, como no caso de IgG, podem levar a uma alta detecção de elevados níveis séricos de IgG anti-EBV em mulheres, o que poderia está relacionado a complicações resultantes da infecção por este vírus e por outros agentes infecciosos, como, por exemplo, HIV e HHV2 (FISCHER et al., 2015; KLEIN; HUBER, 2010; ROBINSON et al., 2011). Contudo, outros estudos são necessários para melhor compreender a relação entre níveis séricos IgG e o sexo dos indivíduos no que diz respeito a patogênese da infecção por EBV.

O estudo também observou um elevado nível sérico de IgG anti-EBV para indivíduos com anemia (média de OD=1.554) quando comparado aqueles sem anemia (média de OD=1.465), com associação significativa ( $p<0,001$ ). Esse resultado corrobora com o de outros estudos que observaram um aumento de IgG anti-EBV em pacientes com algum tipo de anemia (FADEYI et al., 2015; LEE et al., 2016). Fadeyi e colaboradores (2015) realizaram um relato de caso de um homem de 31 anos que apresentava anemia hemolítica autoimune e uma elevada titulação de IgG anti-EBV. Doenças crônicas e certos tipos de anemia, estão relacionadas a reativação do EBV do estado de latência, fazendo com que este se replique com intensidade (THOMASINI et al., 2017; TOUSSIROU; ROUDIER, 2008). Deste modo, altas taxas de IgG séricos apresentados no estudo, podem estar relacionados há reativações constantes do EBV e produções de IgG em indivíduos com anemia.

Referente ao grau de instrução foi verificado que os níveis séricos de IgG estavam mais elevados nos indivíduos sem instrução (média de OD=1751) e menor em

participantes que não estudam (média de OD=1.160) ( $p<0,001$ ). Porém, é importante ressaltar, como dito anteriormente, que a maioria dos indivíduos dentro do grupo que não estudam, são crianças que ainda não estão em idade escolar. Embora não haja estudos que associem o nível sérico de IgG anti-EBV com a escolaridade, observa-se que a maioria dos participantes sem instrução possuem 50 anos ou mais. O fator etário, conforme será discutido a seguir, está relacionado ao elevado nível sérico para IgG anti-EBV.

Quanto o nível sérico de IgG anti-EBV de acordo com a faixa etária, foi observado um aumento exponencial com o aumento da faixa etária, sendo que indivíduos de 60 anos ou mais apresentaram os maiores níveis de IgG ( $p<0,001$ ). Esses dados corroboram com resultados observados por estudos anteriores (DÖLKEN et al., 1984; KURE; KIKUCHI; YOSHIE, 1986; VENKITARAMAN; LENOIR; JOHN, 1985). Harada e colaboradores (2004) observaram um crescente aumento de títulos de IgG anti-EBNA1/2 de acordo com a idade em indivíduos saudáveis de uma população japonesa. Sabe-se que todos os integrantes da família *Herpesviridae*, após infecção primária, possuem capacidade de persistência em células B (TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005). No entanto, como dito anteriormente, assim como outros herpesvírus, o EBV possui a capacidade de reativar e se replicar com intensidade após esse processo e entrar novamente em latência (LI et al., 2016a; TSURUMI; FUJITA; KUDOH, 2005). Por meio deste processo, há um estímulo na produção elevada de anticorpos IgG pelo organismo. Adultos e idosos estão constantemente expostos a fatores que levam a reativação do EBV, como, por exemplo, o estresse (FAGUNDES et al., 2014; GLASER et al., 1991). Outro fator diz respeito a resposta imunológica em idosos que pode ser afetada devido doenças autoimunes e uso de determinados medicamento, gerando reativação do EBV (THOMASINI et al., 2017; TOUSSIROT; ROUDIER, 2008). Porém, estudos adicionais são necessários para melhor compreender o significado dos altos níveis séricos de IgG dentro do contexto da infecção por EBV.

Em suma, os resultados aqui apresentados encontraram uma alta soroprevalência para a infecção por EBV tanto em residentes da cidade de Manaus quanto Presidente Figueiredo. Variáveis como cidade, sexo, faixa etária e escolaridade se mostraram como fatores de susceptibilidade a infecção pelo EBV. Indivíduos residentes de Manaus, mulheres, adultos de 20 a 29 anos e participantes da pesquisa que tinham ensino superior apresentaram maior soroprevalência para EBV. Quanto a níveis séricos de IgG

anti-EBV, indivíduos com anemia apresentam elevada detecção de IgG e observou que o nível sérico do IgG aumentou com a idade dos indivíduos. Para dados mais específicos para infecção por EBV, a realização da detecção de IgM anti-EBV é necessária para distinguir infecção aguda, passada ou uma reativação pelo vírus. Estes resultados são de grande importância para a vigilância epidemiológica da infecção por EBV em nossa região ao caracterizar epidemiologicamente esta infecção, demonstrando qual o grupo populacional de maior risco e os fatores relacionados a estes riscos. Assim, estes achados poderão servir de base para estudos prospectivos que visem principalmente o desenvolvimento de estratégias profiláticas de combate a infecção por EBV junto a estas populações.

## **6.2. Limitações**

É importante ressaltar que este estudo apresentou algumas limitações, como, por exemplo, as amostras provenientes de Manaus poderiam ter uma amostra maior que abrangesse toda região metropolitana. Infelizmente isto não foi possível devido a problemas técnicos no decorrer do projeto. No entanto, o projeto abrangeu duas regiões principais, Manaus e Presidente Figueiredo. Seria importante, também, a realização de testes de avididade de IgG para poder classificar as infecções em passadas ou recentes, porém tais testes foram inviáveis devido a falta de recursos financeiros.

Quanto às análises de nível sérico de IgG anti-EBV, apenas foi possível a avaliação total dessas proteínas (EBNA1, VCA e EA), não possibilitando distinção dos níveis séricos de IgG específico para cada antígeno de EBV. Para estudos futuros, faz-se necessário a detecção separada de nível sérico de IgG para antígenos específicos do EBV, auxiliando na possibilidade de um diagnóstico prévio para doenças ocasionadas pelo EBV

Inicialmente este estudo tinha como objetivo estimar a prevalência dos genótipos 1 e 2 do EBV na população estudada. Todavia, devido a várias complicações técnicas, não foi possível realizar a genotipagem a tempo hábil até a finalização deste projeto. Entretanto, estas análises ainda serão feitas futuramente.

## 7. CONCLUSÃO

- Residentes das cidades de Manaus e Presidente Figueiredo apresentaram uma alta soroprevalência para infecção por EBV;
- Residentes de Manaus, mulheres, adultos entre 20 a 29 anos e indivíduos com ensino superior apresentaram maior soropositividade para infecção por EBV, sugerindo que esses grupos são mais susceptíveis à infecção pelo vírus;
- Valores de nível sérico de IgG anti-EBV foram significativamente maiores em mulheres, participantes com anemia e indivíduos de 60 anos ou mais;
- Os resultados aqui apresentados contribuem com outros trabalhos referentes a epidemiologia do EBV e são de alta importância para vigilância em saúde, pois apresentam dados de susceptibilidade para infecção por EBV, auxiliando em estudos prospectivos que visem estratégias de contenção e conscientização para infecção por EBV.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, M. et al. EBV strain variation: geographical distribution and relation to disease state. **Virology**, v. 190, n. 1, p. 168–75, 1992.
- ALEBOUYEH, M. et al. [Comparative study of the prevalence of Epstein-Barr virus infections in Iran and Germany]. **Monatsschrift Kinderheilkunde: Organ der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde**, v. 132, n. 11, p. 850–1, 1984.
- AMBINDER, R. F.; MANN, R. B. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 2, p. 239–252, 1994.
- ANTONIO, M. A. P. DE L.; RABENHORST, S. H. B. Associação do vírus Epstein-Barr ( EBV ) com tumores sólidos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 85, p. 87–96, 2006.
- ARVEY, A. et al. An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 2, p. 233–245, 2012.
- BABCOCK, G. J.; HOCHBERG, D.; THORLEY-LAWSON, D. A. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 497–506, 2000.
- BAER, R. et al. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. **Nature**, v. 310, n. 5974, p. 207–11, 1984.
- BALFOUR, H. H. et al. Age-Specific prevalence of epstein-barr virus infection among individuals aged 6-19 years in the United States and factors affecting its acquisition. **Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 8, p. 1286–1293, 2013.
- BALFOUR, H. H. et al. Infectious mononucleosis. **Clin Transl Immunology**, v. 4, p. 1-7, 2015.
- BELL, A.; RICKINSON, A. B. Epstein-Barr virus, the TCL-1 oncogene and Burkitt's lymphoma. **Trends in Microbiology**, v. 11, p. 495-497 2003.
- BLACK, F. L. et al. Prevalence of antibody against viruses in the Tiriyo, an isolated amazon tribe. **American Journal of Epidemiology**, v. 91, n. 4, p. 430–438, 1970.
- BRADY, G.; MACARTHUR, G. J.; FARRELL, P. J. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. **Journal of clinical pathology**, v. 60, n. 12, p. 1397–402, 2007.
- BUCK, M. et al. A-type and B-type Epstein-Barr virus differ in their ability to spontaneously enter the lytic cycle. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 2, p. 441–445, 1999.
- BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in african children. **British Journal of**

**Surgery**, v. 46, n. 197, p. 218–223, 1958.

CARVALHO, R. P. S. et al. EBV infections in Brazil. I. Occurrence in normal persons, in lymphomas and in leukemias. **International Journal of Cancer**, v. 11, n. 1, p. 191–201, 1973.

CHEN, C. Y. et al. A large-scale seroprevalence of Epstein-Barr virus in taiwan. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, 2015.

CHESNOKOVA, L. S.; NISHIMURA, S. L.; HUTT-FLETCHER, L. M. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins  $\alpha 6$  or  $\alpha 8$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20464–20469, 2009a.

CHESNOKOVA, L. S.; NISHIMURA, S. L.; HUTT-FLETCHER, L. M. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins  $\alpha 6$  or  $\alpha 8$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 48, p. 20464–20469, 2009b.

CHIJOKE, O.; LANDTWING, V.; MÜNZ, C. NK Cell influence on the Outcome of Primary epstein–Barr virus infection. **Front. Immunol**, v. 7, n. 7, p. 1–7, 2016.

COGHILL, A. E.; HILDESHEIM, A. Epstein-Barr virus antibodies and the risk of associated malignancies: Review of the literature. **American Journal of Epidemiology**, v. 180, n. 7, p. 687–685 2014.

CONDON, L. M. et al. Age-specific prevalence of Epstein-Barr virus infection among Minnesota children: Effects of race/ethnicity and family environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 4, p. 501–508, 2014.

COUNTRYMAN, J.; MILLER, G. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 12, p. 4085–4089, 1985.

CRAWFORD, D. H. et al. Sexual history and Epstein-Barr virus infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 6, p. 731–736, 2002.

CRAWFORD, D. H. et al. A cohort study among university students: identification of risk factors for Epstein-Barr virus seroconversion and infectious mononucleosis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 43, p. 276–282, 2006.

DE-THÉ, G. et al. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. **Nature**, v. 274, n. 5673, p. 756–61, 1978.

DE PASCHALE, M.; CLERICI, P. Serological diagnosis of Epstein-Barr virus infection: Problems and solutions. **World J Virol February World J Virol**, v. 12, n. 11, p. 31–43, 2012.

DELANEY, A. S.; THOMAS, W.; BALFOUR, H. H. Coprevalence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type-1 antibodies among United States children and factors associated with their acquisition. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 4, n. 4, p. 323–329, 2015.

DÖLKEN, G. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for IgG antibodies to Epstein-Barr virus-associated early antigens and viral capsid antigen. **Journal of Immunological Methods**, v. 67, n. 2, p. 225–233, 1984.

EPSTEIN, M. A. Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. **Journal of Experimental Medicine**, v. 121, n. 5, p. 761–770, 1965.

EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. **The Lancet**, v. 283, n. 7335, p. 702–703, 1964.

EVANS, A. S.; GUTENSOHN, N. M. A population-based case-control study of EBV and other viral antibodies among persons with Hodgkin's disease and their siblings. **International Journal of Cancer**, v. 34, n. 2, p. 149–157, 1984.

F.L., B. et al. Evidence for persistence of infectious agents in isolated human populations. **American journal of epidemiology**, v. 100, n. 3, p. 230–250, 1974.

FADEYI, E. A. et al. Fatal Autoimmune Hemolytic Anemia Due to Immunoglobulin G Autoantibody Exacerbated by Epstein-Barr Virus. **Laboratory Medicine**, v. 46, n. 1, p. 55–59, 2015.

FAGUNDES, C. P. et al. Attachment anxiety is related to Epstein-Barr virus latency. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 232–238, 2014.

FEEDERLE, R. et al. The Epstein-Barr Virus Alkaline Exonuclease BGLF5 Serves Pleiotropic Functions in Virus Replication. **Journal Of Virology**, v. 83, n. 10, p. 4952–4962, 2009a.

FEEDERLE, R. et al. The Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and the exonuclease BGLF5 have opposite effects on the regulation of viral protein production. **Journal of virology**, v. 83, n. 21, p. 10877–91, 2009b.

FIGUEIRA-SILVA, C. M.; PEREIRA, F. E. Prevalence of Epstein-Barr virus antibodies in healthy children and adolescents in Vitoria, State of Espirito Santo, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 409–412, 2004.

FISCHER, J. et al. Sex differences in immune responses to infectious diseases. **Infection**, v. 43, n. 2, p. 399–403, 2015.

FITZSIMMONS, L.; KELLY, G. L. EBV and apoptosis: The viral master regulator of cell fate? **Viruses**, v. 13, n. 9, p. 1–34, 2017.

FLAVELL, K. J.; MURRAY, P. G. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus.

**Molecular pathology : MP**, v. 53, n. 5, p. 262–9, 2000.

FLEISHER, G. et al. Primary infection with epstein-barr virus in infants in the united states: Clinical and serologic observations. **Journal of Infectious Diseases**, v. 139, n. 5, p. 553–558, 1979.

FOURCADE, G. et al. Evolution of EBV seroprevalence and primary infection age in a French hospital and a city laboratory network, 2000-2016. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 2017.

FRYER, J. F. et al. A collaborative study to establish the 1st WHO International Standard for Epstein–Barr virus for nucleic acid amplification techniques. **Biologicals**, v. 44, n. 5, p. 423–433, 2016.

FUJII, K. et al. The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 complex. **Journal of virology**, v. 74, n. 6, p. 2550–2557, 2000.

GÄRTNER, B. C. et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 10, n. 1, p. 78–82, 2003.

GERMI, R. et al. Methylation of Epstein–Barr virus Rta promoter in EBV primary infection, reactivation and lymphoproliferation. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 10, p. 1814–1820, 2016.

GERSHBURG, E.; PAGANO, J. S. Epstein-Barr virus infections: Prospects for treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 277–281, 2005.

GLASER, R. et al. Stress-related activation of Epstein-Barr virus. **Brain Behavior and Immunity**, v. 5, n. 2, p. 219–232, 1991.

GOH, S. M. P. et al. Increasing the accuracy and scalability of the Immunofluorescence Assay for Epstein Barr Virus by inferring continuous titers from a single sample dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 440, p. 35–40, 2017.

GRYWALSKA, E.; ROLINSKI, J. Epstein-Barr virus-associated lymphomas. **Seminars in Oncology**, v. 42, p. 291-303, 2015.

HALVORSEN, J. A. et al. Genital ulcers as initial manifestation of epstein-barr virus infection: Two new cases and a review of the literature. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 86, n. 5, p. 439–442, 2006.

HAMILTON, A. J. et al. Autoimmune haemolytic anaemia associated with epstein barr virus infection as a severe late complication after kidney transplantation and successful treatment with rituximab: Case report. **BMC Nephrology**, v. 16, n. 1, 2015.

HAQUE, T. et al. Seroepidemiological study of Epstein-Barr virus infection in Bangladesh. **Journal of Medical Virology**, v. 48, n. 1, p. 17–21, 1996.

HARADA, S. et al. Maintenance of Serum Immunoglobulin G Antibodies to Epstein-

Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 2 in Healthy Individuals from Different Age Groups in a Japanese Population with a High Childhood Incidence of Asymptomatic Primary EBV Infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 11, n. 1, p. 123–130, 2004.

HAYDEN, R. T. et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: A multivariate analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 337–345, 2012.

HENLE, G.; HENLE, W.; DIEHL, V. Relation of Burkitt's Tumor-Associated Herpes-Type Virus To Infectious Mononucleosis\*. **University of Pennsylvania**, v. 59, p. 94–101, 1968.

HESS, R. D. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: Still challenging after 35 years. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.3381-3387, 2004.

HESSE, J. et al. Prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus (EBV) in childhood and adolescence in Denmark. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 15, n. 4, p. 335–338, 1983.

HIGGINS, C. D. et al. A Study of Risk Factors for Acquisition of Epstein-Barr Virus and Its Subtypes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 4, p. 474–482, 2007.

HODGKIN, T. On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. **Medico-chirurgical transactions**, v. 17, p. 68–114, 1832.

HORST, D. et al. The “Bridge” in the Epstein-Barr Virus Alkaline Exonuclease Protein BGLF5 Contributes to Shutoff Activity during Productive Infection. **Journal of Virology**, v. 86, n. 17, p. 9175–9187, 2012.

HOSHINO, Y. et al. Long-term administration of valacyclovir reduces the number of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells but not the number of EBV DNA copies per B cell in healthy volunteers. **Journal of virology**, v. 83, n. 22, p. 11857–61, 2009.

HUANG, W. et al. The Influence of Stress Factors on the Reactivation of Latent Herpes Simplex Virus Type 1 in Infected Mice. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 61, n. 1, p. 115–122, 2011.

HUH, H. J. et al. Performance of the Real-Q EBV Quantification Kit for Epstein-Barr virus DNA Quantification in whole blood. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 147–150, 2017.

HUTT-FLETCHER, L. M. Epstein-Barr Virus Entry. **Journal of virology**, v. 81, n. 15, p. 7825–7832, 2007.

IRA, S. Response to Valacyclovir in an HIV-infected Girl with Epstein Barr Infection. **Indian Pediatrics**, v. 49, p. 409–410, 2012.

IWAKIRI, D. Epstein-Barr virus-encoded RNAs: Key molecules in viral pathogenesis.

**Cancers**, v. 6, n. 2, p. 1615-1630, 2014.

JHA, H. C.; PEI, Y.; ROBERTSON, E. S. Epstein-barr virus: Diseases linked to infection and transformation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-16, 2016.

JIANG, J. H. et al. Hypoxia can contribute to the induction of the Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 37, n. 2, p. 98–103, 2006.

KANG, M.-S.; KIEFF, E. Epstein–Barr virus latent genes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, n. 1, p. e131, 2015.

KEATING, S. et al. The Lytic Cycle of Epstein-Barr Virus Is Associated with Decreased Expression of Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class I and Class II Molecules. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 8179–8188, 2002.

KHAN, I. EBV Infection Resulting in Aplastic Anemia: A Case Report and Literature Review. **Journal of Blood Disorders & Transfusion**, v. 4, n. 2, 2012.

KIMURA, H. Pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection: Is this an infectious disease, lymphoproliferative disorder, or immunodeficiency? **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 1, p. 251-261, 2006.

KLEIN, S. L.; HUBER, S. Sex differences in susceptibility to viral infection. In: **Sex Hormones and Immunity to Infection**. [s.l: s.n.]. p. 93–122.

KOLBERG, M. et al. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2004.

KURE, S.; KIKUCHI, Y.; YOSHIE, O. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Epstein-Barr virus-associated nuclear antigen-1 using a synthetic oligopeptide. **Microbiol. Immunol.**, v. 30, n. 8, p. 831–836, 1986.

KURIYAMA, T. et al. Successful treatment of Rituximab-resistant Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disorder using R-CHOP. **Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH**, v. 54, n. 2, p. 149–53, 2014.

KUSCHNAROFF, T. M. et al. Prevalência da infecção pelo vírus Epstein-Barr em voluntários doadores de sangue e indivíduos com AIDS na cidade de São Paulo. **Arquivos médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 52, n. 1, p. 8–13, 2007.

LAMAR, Z. S. et al. Dose-Adjusted Etoposide, Prednisone, Vincristine, Cyclophosphamide, and Doxorubicin (EPOCH) with or Without Rituximab as First-Line Therapy for Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma. **Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia**, v. 16, n. 2, p. 76–81, 2016.

LANG, D. J.; GARRUTO, R. M.; GAJDUSEK, D. C. Early acquisition of cytomegalovirus and epstein-barr virus antibody in several isolated melanesian populations. **American Journal of Epidemiology**, v. 105, n. 5, p. 480–487, 1977.

LASSOUED, S. et al. Transcription of the epstein-barr virus lytic cycle activator BZLF-

- 1 during oxidative stress induction. **Biological Trace Element Research**, v. 137, n. 1, p. 13–22, 2010.
- LAU, Y. L. et al. Epstein-Barr virus associated aplastic anaemia and hepatitis. **Journal of Paediatrics & Child Health**, v. 30, n. 1, p. 74–76, 1994.
- LEE, J. I. et al. [A Case of Severe Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection with Aplastic Anemia and Hepatitis]. **The Korean journal of gastroenterology = Taehan Sohwagi Hakhoe chi**, v. 67, n. 1, p. 39–43, 2016.
- LEVINE, P. H. et al. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. **Cancer**, v. 27, n. 2, p. 416–421, 1971.
- LI, H. et al. Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis. **Journal of Biological Sciences**, 2016a.
- LI, Y. et al. Epstein-Barr Virus BZLF1-Mediated Downregulation of Proinflammatory Factors Is Essential for Optimal Lytic Viral Replication. **Journal of Virology**, v. 90, n. 2, p. 887–903, 2016b.
- LU, C.-C. et al. Characterization of the Uracil-DNA Glycosylase Activity of Epstein-Barr Virus BKRF3 and Its Role in Lytic Viral DNA Replication. **Journal of Virology**, v. 81, n. 3, p. 1195–1208, 2007.
- MARINKOVIC, D. et al. Identification of novel Myc target genes with a potential role in lymphomagenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 18, p. 5368–5378, 2004.
- MCKENZIE, J. et al. The Epstein-Barr Virus Immune Evasins BCRF1 and BPLF1 Are Expressed by a Mechanism Independent of the Canonical Late Pre-initiation Complex. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, 2016.
- MEKMULLICA, J.; KRITSANEPAIBOON, S.; PANCHAROEN, C. Risk factors for Epstein-Barr virus infection in Thai infants. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 34, n. 2, p. 395–397, 2003.
- MILLER, C. L. et al. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. **Immunity**, v. 2, n. 2, p. 155–166, 1995.
- MONTEIRO, T. A. F., et al. Prevalência de anticorpos para o vírus Epstein-Barr (EBV) em Belém, Pará, Brasil. **Ver Para Med.**, v. 12, n. 2, p. 8-12, 1998.
- MUDERRIS, T. et al. Does Epstein-Barr virus infection have an influence on the development of laryngeal carcinoma? Detection of EBV by Real-Time Polymerase Chain Reaction in tumour tissues of patients with laryngeal carcinoma. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 4, p. 418–423, 2013.
- MUMTSIDU, E. et al. Structural features of the single-stranded DNA-binding protein of Epstein-Barr virus. **Journal of Structural Biology**, v. 161, n. 2, p. 172–187, 2008.
- NAHER, H. et al. Subclinical Epstein-Barr virus infection of both the male and female

genital tract--indication for sexual transmission. **J Invest Dermatol**, v. 98, n. 5, p. 791–793, 1992.

NAKAOKA, V. Y. E. et al. Mononucleose Infecciosa - Uma Revisão De Literatura. **Revista Uningá Review**, v. 16, n. Im, p. 44–48, 2013.

NAKAYAMA, S. et al. Epstein-Barr virus polymerase processivity factor enhances BALF2 promoter transcription as a coactivator for the BZLF1 immediate-early protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 32, p. 21557–21568, 2009.

NEPARIDZE, N.; LACY, J. Malignancies associated with Epstein-Barr virus: Pathobiology, clinical features, and evolving treatments. **Clinical Advances in Hematology and Oncology**, v. 12, n. 6, p. 358–371, 2014.

ODUMADE, O. A.; HOGQUIST, K. A.; BALFOUR, H. H. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 193–209, 2011.

OGEMBO, J. G. et al. A chimeric EBV gp350/220-based VLP replicates the virion B-cell attachment mechanism and elicits long-lasting neutralizing antibodies in mice. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 50, p. 1–14, 2015.

OLD, L. J. et al. Precipitating Antibody In Human Serum To An Antigen Present In Cultured Burkitt's Lymphoma Cells. **Proceeding of National Academy of USA**, v. 56, n. 6, p. 1699–1704, 1966.

OLIVEIRA, J. L. DE et al. O vírus Epstein-Barr e a mononucleose infecciosa. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 6, p. 535–543, 2012.

OZKAN, A. et al. Seropositivity of Epstein-Barr virus in Eastern Anatolian Region of Turkey. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v. 21, n. 1, p. 49–53, 2003.

PANNUTI, C. S. Soro-epidemiologia do vírus de Epstein-Barr (VEB). **Revista de Saude Publica**, 1981.

PAULA, M. L. A. DE et al. Infecção do trato urinário em mulheres com vida sexual ativa. **Jbm**, v. 103, p. 37–41, 2015.

PILERI, S. A. et al. Hodgkin's lymphoma: The pathologist's view point. **Journal of Clinical Pathology**, 2002.

PRATT, Z. L.; ZHANG, J.; SUGDEN, B. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1) Oncogene of Epstein-Barr Virus Can Simultaneously Induce and Inhibit Apoptosis in B Cells. **Journal of Virology**, v. 86, n. 8, p. 4380–4393, 2012.

**Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997.** IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for

Research on Cancer. **Anais...**1997

QUINN, L. L. et al. The Missing Link in Epstein-Barr Virus Immune Evasion: the BDLF3 Gene Induces Ubiquitination and Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) and MHC-II. **Journal of virology**, v. 90, n. 1, p. 356–67, 2016.

RABSON, M. et al. Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. **Journal of virology**, v. 44, n. 3, p. 834–844, 1982.

REEDMAN, B. M. et al. Epstein-Barr virus-associated complement-fixing and nuclear antigens in Burkitt lymphoma biopsies. **International Journal of Cancer**, v. 13, n. 6, p. 755–763, 1974.

RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigenese humana. **Medicina**, 2003.

RICKINSON, A. B.; YOUNG, L. S.; ROWE, M. Influence of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA 2 on the Growth Phenotype of Virus-Transformed B Cells. **Journal of Virology**, v. 61, n. 5, p. 1310–1317, 1987.

ROBINSON, D. P. et al. Elevated 17 $\beta$ -estradiol protects females from influenza A virus pathogenesis by suppressing inflammatory responses. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, 2011.

SAMPLE, J. et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. **Journal of virology**, v. 64, n. 9, p. 4084–4092, 1990.

SIMON, K. C.; MUNGER, K. L.; ASCHERIO, A. XVI European Charcot Foundation lecture: Nutrition and environment, can MS be prevented? **Journal of the Neurological Sciences**, 2011.

SIVACHANDRAN, N.; WANG, X.; FRAPPIER, L. Functions of the Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein in Viral Reactivation and Lytic Infection. **Journal of Virology**, v. 86, n. 11, p. 6146–6158, 2012.

SMATTI, M. K. et al. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 2017a.

SMATTI, M. K. et al. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. e0189033, 2017b.

STANCIU, M.; MIHĂILESCU, A. Purchasing Power of the Low Income Population from Romania During the Crisis. **Procedia Economics and Finance**, v. 8, p. 466–473, 2014.

SU, M.-T. et al. Uracil DNA glycosylase BKRF3 contributes to Epstein-Barr virus DNA replication through physical interactions with proteins in viral DNA replication

- complex. **Journal of virology**, v. 88, n. 16, p. 8883–99, 2014.
- SUNTORNLOHANAKUL, R. et al. Seroprevalence of Anti-EBV IgG among Various Age Groups from Khon Kaen Province, Thailand. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 16, n. 17, p. 7583–7, 2015.
- TAKEUCHI, K. et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in Japan: Trends and future prediction. **Pathology International**, v. 56, n. 3, p. 112–116, 2006.
- THOMASINI, R. L. et al. Aged-associated cytomegalovirus and Epstein-Barr virus reactivation and cytomegalovirus relationship with the frailty syndrome in older women. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 2017.
- TOMKINSON, B.; ROBERTSON, E.; KIEFF, E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. **Journal of virology**, v. 67, n. 4, p. 2014–2025, 1993.
- TOUSSIROT, E.; ROUDIER, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 22, n. 5, p. 883–96, 2008.
- TROTTIER, H. et al. Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: A retrospective cohort study in children. **Transfusion**, v. 52, n. 12, p. 2653–2663, 2012.
- TSURUMI, T.; FUJITA, M.; KUDOH, A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. **Reviews in Medical Virology**, v. 15, n. 1, p. 3-15, 2005.
- VENKITARAMAN, A. R.; LENOIR, G. M.; JOHN, T. J. The seroepidemiology of infection due to Epstein-Barr virus in southern India. **Journal of Medical Virology**, v. 15, n. 1, p. 11–16, 1985.
- VEZINA, H. E. et al. Valacyclovir pharmacokinetics and exploratory pharmacodynamics in young adults with Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. **Journal of clinical pharmacology**, v. 50, n. 7, p. 734–742, 2010.
- WANG, D.; LIEBOWITZ, D.; KIEFF, E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. **Cell**, v. 43, n. 3 PART 2, p. 831–840, 1985.
- WEISS, E. et al. High Epstein-Barr Virus Load and Genomic Diversity Are Associated with Generation of gp350-Specific Neutralizing Antibodies following Acute Infectious Mononucleosis. **Journal Virology**, v. 91, n. 1, p. 1–16, 2017.
- WEISS, L. M. et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. **The American journal of pathology**, v. 139, n. 6, p. 1259–65, 1991.
- WOLF, H., ZUR HAUSEN, H., BECKER, V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. **Nature**, v. 244, n. 138, p. 245–247, 1973.
- WOOD, A. J. J.; BALFOUR, H. H. Antiviral Drugs. **New England Journal of**

**Medicine**, v. 340, n. 16, p. 1255–1268, 1999.

YAP, Y.-Y. et al. Epstein-Barr virus DNA detection in the diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. **Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 136, n. 6, p. 986–991, 2007.

YATES, J. L.; WARREN, N.; SUGDEN, B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. **Nature**, v. 313, n. 6005, p. 812–815, 1985.

YOUNG, L. S. et al. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. **Journal of General Virology**, v. 69, n. 5, p. 1051–1065, 1988.

YOUNG, L. S.; DAWSON, C. W.; ELIOPOULOS, A. G. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. **Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology**, 2000.

ZENG, Y. et al. Prospective studies on nasopharyngeal carcinoma in Epstein-Barr virus IgA/VCA antibody-positive persons in Wuzhou City, China. **Int J Cancer**, v. 36, n. 5, p. 545–547, 1985.

ZHAO, L. et al. Chlorpyrifos Induces the Expression of the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Activator BZLF-1 via Reactive Oxygen Species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UFAM  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Saúde Coletiva

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa "FATORES ASSOCIADOS AO ACESSO E USO DE INSUMOS E SERVIÇOS DE SAÚDE NA ZONA METROPOLITANA DE MANAUS", sob a responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Marcus Tolentino Silva, a qual pretende descrever a situação de acesso, utilização e qualidade da atenção à saúde na Zona Metropolitana de Manaus.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de uma entrevista, onde faremos perguntas a respeito de sua vida e características pessoais, da sua condição de saúde e sobre acesso aos serviços de saúde. São previstos de 20 a 30 minutos de duração.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos ou inexistentes. As informações que serão fornecidas são confidenciais. Quando os resultados do trabalho forem divulgados, serão de forma global e anônimos. Não haverá detalhamento de cada indivíduo, então a sua privacidade será mantida. Não será necessário efetuar qualquer pagamento. Se você aceitar participar, estará contribuindo para conhecer a situação atual e apontar possíveis soluções do acesso a serviços de saúde.

Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador na Faculdade de Medicina da UFAM, no endereço Rua Afonso Pena, 1053, pelos telefones (92) 3343-7957 ou (92) 98413-4388 ou (92) 98400-2172 ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adnanópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130.

#### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura para autorização: \_\_\_\_\_

ou Impressão digital:

Assinatura do entrevistador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_, Amazonas, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_



## **APÊNDICE B:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

**TÍTULO DA PESQUISA:** “Análise molecular, imunológica, bioquímica e hematológica das infecções pelos vírus Citomegalovírus (CMV) e Epstein-Barr (EBV) e o desenvolvimento da autoimunidade”

Convidamos o (a) Sr (a) para participar desta pesquisa sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Gemilson Soares Pontes. Abaixo seguem os dados para sua informação referentes ao estudo que o Sr (a) está sendo convidado para participar de forma voluntária.

**Objetivo:** Estimar a prevalência da infecção por CMV e EBV na cidade de Manaus, AM.

**Justificativa:** Investigar a infecção pelo CMV e EBV na Amazônia Ocidental, principalmente na área metropolitana de Manaus, é de grande importância, pois as informações geradas a partir deste estudo poderão esclarecer a epidemiologia destes vírus na região e no Brasil, além de permitir um maior esclarecimento sobre a imunopatologia destas infecções. Sugestões educativas serão implementadas a partir dos dados gerados no estudo, tais como, orientação sobre higiene pessoal e cuidados com aglomerações, por exemplo, de modo a minimizar a propagação dos vírus.

**Metodologia:** As amostras coletadas serão devidamente transportadas ao laboratório de Virologia do INPA onde serão submetidas à análise sorológica por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para verificar a presença de anticorpos anti-CMV e anti-EBV.

**Garantia de manutenção do sigilo e da privacidade do participante:** Asseguramos ao participante da pesquisa confidencialidade, bem como o direito de recusar-se a responder as perguntas que ocasionem constrangimentos de qualquer natureza. Todas as informações geradas pelo presente estudo serão conduzidas no mais

absoluto sigilo e os pacientes terão acesso aos dados gerados pelo estudo sempre que desejarem.

**Desconfortos, riscos:** Os riscos referentes a esse estudo são considerados mínimos uma vez que serão coletadas amostras sanguíneas por profissionais altamente treinados.

**Forma de acompanhamento, assistência e garantia de indenização:** No caso de haver algum incidente em decorrência do processo de coleta das amostras sanguíneas, o pesquisador responsável garante assistência médica e indenização adequada, caso seja necessário.

**Benefícios:** Se você aceitar participar deste estudo, estará contribuindo para uma melhor compreensão sobre a epidemiologia sorológica e molecular do CMV e EBV na Amazônia ocidental, assim como permitirá um maior esclarecimento sobre a patogenia decorrente da infecção por estes vírus, o que pode auxiliar em uma melhor compreensão da evolução, assim como no tratamento, de muitas patologias a curto e a longo prazo. Tais informações serão de grande importância para vigilância epidemiológica do CMV e, conseqüentemente, para o combate à infecção por estes vírus.

**Garantia de plena liberdade ao participante da pesquisa:** Sua participação é voluntária e se dará por meio da assinatura deste termo onde sua participação será oficializada e confirmada. Se depois de consentir em sua participação o Sr (a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa.

O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr (a) poderá entrar em contato com o pesquisador Gemilson Soares Pontes sempre que desejar no endereço Av. André Araújo, – aleixo -I, 69077-000 Manaus - AM, pelo telefone (92) 3643-3288.

Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, discuti com o pesquisador sobre a minha decisão em participar nesse estudo e acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações sobre o estudo acima citado que li ou que foram lidas para mim. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou prejuízos e sem a perda de atendimento nesta Instituição ou qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Eu receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a outra ficará com o pesquisador responsável por essa pesquisa. Além disso, estou ciente de que eu (ou meu representante legal) e o pesquisador responsável deveremos rubricar todas as folhas desse TCLE e assinar na última folha

\_\_\_\_\_

Nome do participante da Pesquisa

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do participante

\_\_\_\_\_

Nome do representante legal

\_\_\_\_\_

Assinatura do representante legal



Impressão do dedo polegar.

Caso não saiba assinar

## APÊNDICE C: Inquérito Epidemiológico - Manaus

**TÍTULO DA PESQUISA:** Análise Molecular, imunológica e Hematológica das infecções por Citomegalovírus e Epstein-Barr e o desenvolvimento de autoimunidade.

Este inquérito tem por objetivo diagnosticar e caracterizar em termos moleculares, imunológicos, bioquímicos e hematológicos as infecções por CMV em indivíduos residentes de Manaus e investigar as possíveis associações com o desenvolvimento da autoimunidade.

Nº \_\_\_\_\_

1. Gênero:  Masculino  Feminino

2. Idade: \_\_\_\_\_

3. Grupo étnico:  Negro  Branco  Pardo  Indígena  Outro:

\_\_\_\_\_

4. Estado civil:  Solteiro (a)  Casado (a)  União Estável

5. Renda familiar:  até um salário mínimo  2 a 5 salários mínimos  6 a 9 salários mínimos

acima de 10 salários mínimos.

6. Grau de Instrução:  Alfabetizado (a)  1º Grau completo  2º Completo

Nível Superior Outros: \_\_\_\_\_

7. Ocupação: \_\_\_\_\_

8. Orientação Sexual:  Heterossexual  homossexual  bissexual

9. Parceiro fixo  Múltiplos parceiros   Não declarar

10. Faz uso de preservativo?  Não  Sim  Nem sempre
11. Faz ou já fez o uso de drogas injetáveis? Não  Sim
12. Foi diagnosticado com alguma doença sexualmente transmissível nos últimos 6 meses?  
 Não  sim (Qual? \_\_\_\_\_)
13. Foi submetido a algum processo de transfusão de sangue no último ano?  
 Não  sim Qual componente? \_\_\_\_\_ Quantas vezes:  
\_\_\_\_\_
14. Tem filhos?  Não  Sim Quantos? \_\_\_\_\_
15. Algum aborto?  Não  Sim Quantos? \_\_\_\_\_
16. Algum filho com deficiência?  Não  Sim Qual? \_\_\_\_\_
17. Possui Tatuagem e/ ou piercing  Não  Sim
18. Tem algumas das doenças abaixo:  
 Diabetes Mellitus  Lupus  Artrite Reumatoide  Doença Renal  
 Outras: \_\_\_\_\_

APÊNDICE D: Inquérito Epidemiológico – Presidente Figueiredo

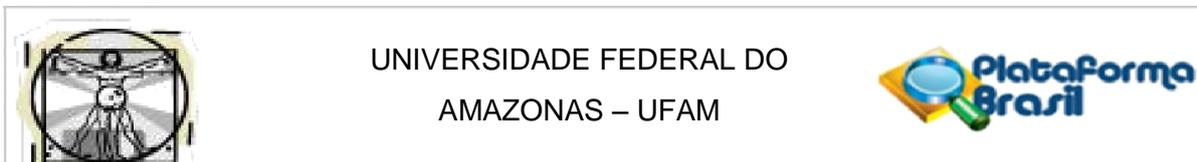
QUESTIONÁRIO  
QUESTIONARIO\_PROJETO\_PRESIDENTE\_FIGUEIREDO\_ITACOATIARA

Nome: {NOME} \_\_\_\_\_ Sigla: {sig} \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_  
 Filiação: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Registro: {REG} \_\_\_\_\_ Data de Nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Idade: {I} \_\_\_\_\_ Gênero: {GENER} ( ) Masculino [0] ( ) Feminino [1]

01. Qual a sua renda ( ) Não ( ) Até 1 ( ) Até 2 ( ) Até 3 ( ) Mais de 4  
 Salarial: trabalha salário salários salários salários  
 02. Você estuda? {EST} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 03. Nível de escolaridade: {NESC} ( ) Alfabetiz.[0] ( ) Até 4 FM[1] ( ) Até 8 FM[2] ( ) Até 3 MD[3]  
 Superior incompleto ( ) Superior ( )  
 04. Número de irmãos:{NIRM} ( ) 0 [0] ( ) 1 [1] ( ) 2 [2] ( ) 3 [3] ( ) 4 ou + [4]  
 05. Familiares com Anemia? {FANEM} ( ) Nenhum[0] ( ) Pai [1] ( ) Mãe [2] ( ) Irmão [3]  
 06. Idade primeira menstruação: {IPM} ( ) Não menst.[0] ( ) 09-11[1] ( ) 12-14 [2] ( ) 15-17 [3]  
 07. Já engravidou? {ENGRA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 08. Está grávida? {GRA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 09. Usa anticoncepcional? {ANTICO} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 10. Menstruação é regular? {MREG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 11. Já esteve internado? {INTER} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, quantas vezes? {QINTER} ( ) 1 [0] ( ) 2-5 [1] ( ) 6-10 [2] ( ) 11 ou + [3]  
 Qual especialidade? {ESPEC} ( ) Cardiologia [0] ( ) Oftalmologia [1] ( ) Neurologia [2]  
 ( ) Infectologia [3] ( ) Pneumologia [4] ( ) Cirurgia [5]  
 ( ) Angiologia [6] ( ) Nefrologia [7] ( ) Clínica da Dor [8]  
 ( ) Outras [9]  
 12. Infecções: {INFEC} ( ) NÃO[0] ( ) SIM [1]  
 Quais? {DESCINFEC} ( ) Rinite [0] ( ) Sinusite [1] ( ) Otite [2]  
 ( ) Faringite [3] ( ) Amigdalite [4] ( ) Outros [5]  
 13. Fez uso de alguma medicação? {MINFEC} ( ) SIM [0] ( ) NÃO [1]  
 Se SIM, fez uso de profilaxia antibiótica? {PROFANTIB} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 14. Possui outra patologia? {PATOLOG} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Quais? {DESCPATOLOG} ( ) Hipertensão [0] ( ) Diabetes [1] ( ) Obesidade [2] ( ) Outras [3]  
 15. Você trabalha? {TRAB} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Tipo de profissão: {QTRAB} \_\_\_\_\_  
 Se SIM, manipula alguma substância química? {SUBQUIM} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Qual? {QSUBQUIM} \_\_\_\_\_ Freqüência? {FREQSUBQUI} \_\_\_\_\_  
 Manipula diretamente esta subst? {MANIDIRE} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 16. Pratica esportes? {ESPOR} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 17. Faz uso de bebida alcoólica? {BEBE} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, que freqüência? {FREQBEBE} \_\_\_\_\_  
 18. Você fuma? {FUMA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Se SIM, que freqüência? {FREQFUMA} \_\_\_\_\_  
 19. Faz uso de alguma droga? {DROGA} ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 Em caso de SIM, que freqüência? {FREQDROGA} \_\_\_\_\_  
 20. Você tem sorologia positiva para algum vírus? ( ) NÃO [0] ( ) SIM [1]  
 ( ) HIV ( ) HTLV ( ) HEPATI – QUAL ( ) CMV ( ) Outra – Qual ( ) \_\_\_\_\_  
 21. Qual seu Grupo Sanguíneo {GS} ( ) {RH} ( ) [1]Pos [2]Neg

## ANEXOS

### ANEXO A: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
AMAZONAS – UFAM



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Caracterização clínico laboratorial de adultos residentes na Zona Metropolitana de Manaus

**Pesquisador:** Marcus Tolentino Silva

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:**4

**CAAE:** 53215816.6.0000.5020

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina - UFAM

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.541.710

**Apresentação do Projeto:**

Não se aplica.

**Objetivo da Pesquisa:**

Não se aplica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O principal risco da pesquisa advém do procedimento de coleta de sangue periférico, que será realizado em um dos braços dos participantes utilizando seringa e agulha hipodérmica. A coleta pode ocasionar dor ou desconforto pela introdução da agulha e hematoma no local da inserção. Outro risco inerente é a troca de amostras, por problemas de identificação. Para minimizar tais riscos será contratado laboratório de análises clínicas com certificação de qualidade e humanização de atendimento, de modo que todos os coletores sejam treinados para realizar o procedimento com o mais alto rigor técnico. A identificação da amostra será realizada por meio de etiquetas com sistema de códigos de barras e confirmadas pelos próprios pacientes (identificação positiva), o que aumenta a segurança do procedimento.

**Endereço:** Rua Teresina, 4950

**Bairro:** Adrianópolis

**CEP:** 69.057-070

**UF:** AM

**Município:** MANAUS

**Telefone:** (92)3305-5130

**Fax:** (92)3305-5130

**E-mail:** cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.541.710

Biorepositório / Biobanco	Declara_coparticip.pdf	02/04/2016 12:49:06	Marcus Tolentino Silva	AAceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	16/01/2016 17:17:22	Marcus Tolentino Silva	AAceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 12 de Maio de 2016

---

**Assinado por:**

**Eliana Maria Pereira da Fonseca (Coordenador)**

**Endereço:** Rua Teresina, 4950  
**Bairro:** Adrianópolis **CEP:** 69.057-070  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3305-5130 **Fax:** (92)3305-5130 **E-mail:** Ecep@ufam.edu.br