



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**DETECÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DE EPSTEIN BARR (EBV)
EM TECIDOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE HODGKIN DA
REGIÃO NORTE DO BRASIL**

TALITA ANTONIA FURTADO MONTEIRO

Belém-Pará
2010

TALITA ANTONIA FURTADO MONTEIRO

**DETECÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DE EPSTEIN BARR (EBV)
EM TECIDOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE HODGKIN DA
REGIÃO NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biológica de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

Belém-Pará
2010

Monteiro, Talita Antonia Furtado

Detecção do genoma do vírus de Epstein Barr (EBV) em tecidos de pacientes com doença de Hodgkin da região Norte do Brasil / Talita Antonia Furtado Monteiro. Belém: Universidade Federal do Pará, 2010.

99f. il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

1. Vírus Epstein-Barr. 2. Doença de Hodgkin. 3. Gene *EBER 1*. 4. Gene *EBNA 1*. 5. I. Universidade Federal do Pará. II. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616. 578

TALITA ANTONIA FURTADO MONTEIRO

DETECÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DE EPSTEIN BARR (EBV)
EM TECIDOS DE PACIENTES COM DOENÇA DE HODGKIN DA
REGIÃO NORTE DO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador:

Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
*Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto
Evandro Chagas (IEC)*

Banca Examinadora

Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes
*Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas do Instituto
Evandro Chagas (IEC)*

Dr. Wyller Alencar de Mello
Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC)

Profa. Dra. Rosa Helena Porto Gusmão
Universidade do Estado do Pará (UEPA)

Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas (suplente)
Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas (IEC)

Belém, 24 de agosto de 2010

“Ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; as ovelhas sejam arrebatadas do aprisco, e nos currais não haja gado; todavia, eu me alegro no Senhor, exulto no DEUS da minha Salvação” (Habacuque 3.17-18).

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, pela dádiva de ter uma família abençoada.

A meus pais, Raimundo Ramos (*in memoriam*) e Ada Zíbia Furtado de Miranda, pelo exemplo de Fé, bondade e carinho que a cada dia me dão vigor para alcançar todos os meus objetivos.

Ao meu esposo, José Luiz da Costa Monteiro e aos meus filhos José Luiz e Jessé Luiz que tem sido o meu incentivo para buscar novas conquistas.

Aos meus irmãos Daniel e Euda Miranda que alegraram a nossa casa, depois de 15 anos como filha única.

Ao Instituto Evandro Chagas, em especial a diretora Dra. Elisabeth Santos minha admiração por sua garra, determinação e conquistas em prol da pesquisa Brasileira.

Ao meu orientador Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos meus sinceros agradecimentos pela sua amizade e oportunidade de concretizar este sonho, contribuindo para o meu crescimento profissional.

A Coordenação da Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários e aos professores Antonio Valinoto, Luiz Fernando, Reinalda Lanfredi, Max Reis, Sílvia Silva, Ricardo Ishak, Alexandre Casseb e Pedro Fernando Vasconcelos por dedicar seu tempo e sua sabedoria para que nossa formação fosse um aprendizado de vida.

A Dra. Vanda Arnaud e a equipe do Departamento de Patologia do Hospital Ofir Loyola pelo apoio e permissão em utilizar as amostras.

A Dra. Vera Barros e ao técnico de pesquisa Valter Miranda pela valiosa colaboração no preparo das lâminas para a realização da metodologia de Hibridização *In Situ*.

A Carmem Oliveira pela amizade e apoio nas análises estatísticas realizadas.

A equipe da Biblioteca em especial aos bibliotecários Vânia Barbosa Cunha Araújo e Nilton César Mendes Pereira pelas sugestões e formatação dessa dissertação.

Aos pesquisadores da Seção de Virologia do IEC: Alexandre da Costa Linhares, Wyller Mello, Maria de Lourdes Contente Gomes, Ronaldo Barros de Freitas, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas, Yvone Gabbay, Consuelo Oliveira e Olinda Macedo pelo convívio ao longo dos anos que certamente contribuíram para a minha formação como virologista.

Aos técnicos do Laboratório de vírus Epstein Barr, Alessandra Polaro e Antonio de Moura e todos os estagiários do Programa de Iniciação Científica (PIBIC CNPq / FAPESPA), CIEE e PIBIC Jr que me ajudaram nas atividades de campo.

Aos colegas da Pós-graduação (BAIP/UFGA): Candida Abraão, Marluce Moraes, Joana Favacho, Helena Baldez, Hamilton Monteiro e Olinda Macedo pela amizade e convívio durante o nosso curso.

A equipe do Geoprocessamento do IEC pela edição dos mapas.

A todos que compartilharam deste sonho, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	9
RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 VÍRUS DE EPSTEIN BARR.....	16
1.1.1 Breve histórico.....	16
1.1.2 Morfologia e organização genômica.....	18
1.1.3 Diversidade genética do EBV.....	21
1.1.4 Fisiopatologia.....	21
1.1.4.1 Infecção lítica.....	23
1.1.4.2 Infecção latente.....	24
1.2 VÍRUS DE EPSTEIN BARR E CÂNCER.....	26
1.2.1 Doença de Hodgkin.....	29
1.3 VÍRUS DE EPSTEIN BARR E DOENÇA DE HODGKIN.....	32
1.3.1 Aspectos epidemiológicos.....	32
1.4 OBJETIVOS.....	35
1.4.1 Geral.....	35
1.4.2 Específicos.....	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 PACIENTES.....	36
2.2 ESPÉCIMES BIOLÓGICOS.....	36

2.3 MÉTODOS LABORATORIAIS.....	37
2.3.1 Hibridização <i>In Situ</i>.....	37
2.3.1.1 Pré-tratamento	38
2.3.1.2 Hibridização.....	38
2.3.1.3 Detecção.....	38
2.3.2 PCR em Tempo Real.....	39
2.3.2.1 Pré-tratamento das amostras de tecidos fixados em parafina.....	40
2.3.2.2 Extração do DNA.....	41
2.3.2.3 Identificação do gene <i>EBNA 1</i> por PCR em Tempo Real.....	42
2.3.2.3.1 <i>Interpretação dos resultados</i>	44
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
3 RESULTADOS.....	46
3.1 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS.....	50
3.2 IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>EBER 1</i> DO EBV POR HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	54
3.3 IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>EBNA 1</i> POR PCR EM TEMPO REAL.....	60
4 DISCUSSÃO.....	62
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXOS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática tridimensional dos <i>Herpesvírus</i>	19
Figura 2 –	Representação da estrutura do genoma do EBV. Cinco domínios compõem a seqüência única (U1-U5).....	20
Figura 3 –	Produtos da infecção pelo EBV na célula humana, expressão de BZLF-1 (Zebra) no ciclo lítico.....	24
Figura 4 –	Produtos da infecção pelo EBV na célula humana, produção de <i>EBER</i> , <i>EBNA</i> e <i>LMP</i> na infecção latente.....	25
Figura 5 –	Células de <i>REED-STERNBERG</i> . Caracterizada por célula binucleada com nucléolos grandes e eosinófilos, dando o clássico aspecto em <u>olho de coruja</u>	30
Figura 6 –	Distribuição por sexo dos casos de linfomas diagnosticados no período de 1996 a 2005.....	46
Figura 7 –	Procedência dos casos de linfomas pesquisados no período de 1996 a 2005.....	47
Figura 8 –	Distribuição dos casos de linfomas (n=118) por faixa etária no período de 1996 a 2005.....	48
Figura 9 –	Distribuição dos tipos de linfomas diagnosticados (n=118) no Departamento de Patologia do Hospital Ofir Loyola, no período de 1996 a 2005.....	49
Figura 10 –	Distribuição dos casos de linfomas (n=118) por ano de diagnóstico no período de 1996 a 2005.....	50
Figura 11 –	Distribuição dos casos de linfomas não Hodgkin (n=53) de acordo com o sexo.....	51
Figura 12 –	Distribuição por sexo dos casos de doença de Hodgkin diagnosticados no período de 1996 a 2005.....	51

Figura 13 – Distribuição por faixa etária dos casos de doença de Hodgkin no período de 1996 a 2005.....	52
Figura 14 – Distribuição dos subtipos de DH diagnosticados no HOL no período de 1996 a 2005.....	53
Figura 15 – Distribuição dos subtipos de DH por faixa etária no período de 1996 a 2005.....	54
Figura 16 – Distribuição por sexo dos casos de DH/EBV positivo para o gene <i>EBER 1</i> do EBV.....	55
Figura 17 – Distribuição por faixa etária dos casos de doença de Hodgkin positivos (n=50) para o gene <i>EBER 1</i> do EBV.....	56
Figura 18 – Procedência dos casos de DH positivos para o gene <i>EBER 1</i> do EBV no período de 1996 a 2005.....	57
Figura 19 – Distribuição por faixa etária segundo os subtipos de DH positivos para o gene <i>EBER 1</i> do EBV.....	59
Figura 20 – Curva padrão de amplificação para cálculo da quantificação da carga viral das amostras analisadas por PCR em Tempo Real.....	60
Figura 21 – Comparação entre as 49 amostras de doença de Hodgkin analisadas por HIS e PCR em Tempo Real.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	percentagem
®	marca registrada
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micromêtro
µM	micromolar
<	menor
>	maior
BHRF	<i>Right-ward open reading frame</i> / Produção de enzimas
bp	pares de bases
BSA	<i>Bovine Seroalbumin</i> / soro albumina bovina
BZLF	<i>Left-ward open reading frame</i> / Proteína transativadora do EBV
C	citosina
C ₃ D	Fração 3 do complemento
CD	<i>Cluster of differentiation</i> / Denominação de diferentes receptores presentes na superfície dos linfócito
CD15	Molécula de superfície da célula B
CD21	Molécula de superfície da célula B
CD30	Molécula de superfície da célula B
CD40	Molécula de superfície de célula B
CD43	Molécula de superfície de célula B
CD45	Molécula de superfície de célula B
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa

CM	Celularidade mista
DH	Doença de Hodgkin
DL	Depleção linfocitária
dNTPs	desoxirrinucleótidos trifosfatados
EA	<i>Early antigen</i> / Antígeno precoce do EBV
EBER	<i>Epstein Barr small RN</i> / Pequeno RNA viral do EBV
EBNA	<i>Epstein Barr viral nuclear antigen</i> / Antígeno nuclear do EBV
EBV	<i>Epstein Barr virus</i> / Vírus de Epstein Barr
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMA	Antígeno Epitelial de Membrana
EN	Esclerose nodular
EtBr	Brometo de etídio
EUA	Estados Unidos da América
FAM	Fluoróforo que emite menor comprimento de onda demonstrado na cor azul
G	guanina
g	grama
GP 350	Glicoproteína 350
H/RS	célula de <i>Reed-Sternberg</i>
HCl	Ácido clorídrico
HHV-3	Vírus da varicela-zóster
HHV-4	Vírus de Epstein Barr
HHV-5	Citomegalovírus
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HIV	Human immunodeficiency virus / vírus da imunodeficiência humana

HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> / antígeno leucocitário humano
HOL	Hospital Ofir Loyola
HSV	<i>Vírus Herpes Simplex</i>
IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i> / Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imunohistoquímica
IL 10	<i>Human Interleukin 10</i> / interleucina 10
<i>In vitro</i>	Procedimento realizado em ambiente controlado como em um ou placa de <i>Petri</i> .
<i>In vivo</i>	Dentro do vivo; procedimento que ocorre ou tem lugar dentro de um organismo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IR	Seqüência de repetição interna do genoma do EBV
Kb	Kilobase
KCl	cloreto de potássio
kDa	Kilodaltons
L	<i>Late</i> / Tardio
LB	Linfoma de Burkitt
LMP	<i>Latent membran protein</i> / proteína de membrana do linfócito
LNH	Linfoma não Hodgkin
M	molar

MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> / Complexo principal de histocompatibilidade
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NK	Natural Killer
nm	Nanômetro
NM 23	Proteína supressora de metástase
°C	Graus Celsius
OD	Densidade óptica
ORF	<i>Open Reading Frames</i> / Seqüência de leitura aberta
p 53	Gene supressor de tumor
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i> / Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia mediada pela polimerase
pH	Concentração hidrogeniônica
PK	Proteinase K
PL	Predominância linfocitária
PM	Peso molecular
pmoles	Picomoles

q.s.p.	quantidade suficiente para
R ²	Coeficiente de correlação
RCBP	Registro de Base Populacional
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
RS	Célula de <i>Reed Stenberg</i>
SIA	Sistema de Informação Ambulatorial
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TE	Tampão Tris-EDTA
TR	Terminal repeats / regiões de repetições terminais
Tris-Hcl	Tris ácido clorídrico
u	Unidade
U1	Seqüência única do genoma do EBV
U2	Seqüência curta do genoma do EBV
UV	Ultravioleta
v	Volume
V	Volts
VCA	<i>Capsid viral antigen</i> / Antígeno do Capsídeo Viral
VIC	Fluoróforo que emite a cor verde
χ^2	Qui – quadrado

RESUMO

O vírus de Epstein Barr (EBV) é o agente causador da mononucleose infecciosa e está associado com várias desordens proliferativas malignas tais como: linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin e linfomas não Hodgkin. Um total de 118 casos de linfomas diagnosticados no Hospital Ofir Loyola no período de 1996 e 2005 foram analisados no Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Brasil; com o objetivo de detectar o genoma do EBV mediante a identificação dos genes *EBER 1* e *EBNA1* em casos de doença de Hodgkin. Os espécimes parafinizados foram analisados por hibridização *in situ* (gene *EBER 1*) e PCR em tempo real (*EBNA 1*). Do total, 61% (72/118) dos pacientes eram do sexo masculino e 39% (46/118) do sexo feminino com faixa etária variando entre 3-98 anos. Sessenta e cinco (55%) foram diagnosticados como doença de Hodgkin e cinquenta e três (45%) como linfomas não-Hodgkin. O EBV foi identificado nas células *Reed Sternberg* e variantes em 76,9% (50/65) dos casos de linfoma de Hodgkin com idade média de 28,3 anos (variação, 2-84 anos). Os subtipos histológicos de casos EBV-positivos foram o seguinte: esclerose nodular em 50% (25/50), celularidade mista em 28% (14/50), depleção linfocitária em 14% (7/50) e predominância linfocitária em 8% (4/50). O DNA do EBV foi detectado em 53% (26/49) com um coeficiente de regressão para a curva padrão de 0,99. Este estudo foi a primeira descrição do vírus de Epstein Barr em casos de doença de Hodgkin na região Norte do Brasil; reforçando a hipótese de que o EBV seja um co-fator no processo de transformação neoplásica em conjunto com a predisposição genética e imunidade do paciente, justificando a condução de estudos posteriores a nível molecular.

ABSTRACT

EBV is the causative agent of infectious mononucleosis and is associated with several malignant proliferative disorders such as Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, some B and T cell non-Hodgkin's lymphomas. A total of 118 cases of lymphomas diagnosed between 1996 and 2005 were obtained from Instituto Ofir Loyola and analyzed at the Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Brazil. The main objective of the study was to assess the association of Hodgkin's disease subtypes with sex, age, geographic origin and to determine the prevalence of EBER 1 gene and EBNA 1 gene in cases of Hodgkin's disease. The EBV antigens using EBER 1 probe *in situ* hybridization (HIS) and real time quantitative PCR EBV DNA were detected in forty-nine and which were compared with HIS. From the total were obtained 61% (72/118) were male and 39% (46/118) female; patient age ranged from 3 to 98 years. Sixty-five (55%) were diagnosed as having Hodgkin's disease and fifty-three (45%) were non-Hodgkin's malignant lymphomas. EBV was identified in the Reed-Sternberg cells and variants in 77% (50/65) of Hodgkin's disease cases, the median age were 28.3 years (range, 2-84). The histologic subtypes of EBV-positive cases were as follows: nodular sclerosis in 50% (25/50), mixed cellularity in 28% (14/50), lymphocyte depletion in 14% (7/50) and lymphocyte predominance in 8% (4/50). We detected EBV DNA in 53% (26/49) with a coefficient of regression for the standard curve of a minimum of 0.99. These results were the first demonstration of the role of Epstein Barr virus in cases of Hodgkin diseases in northern Brazil and are consistent with the hypothesis that the presence of EBV during neoplastic transformation could be an additional co-factor acting together with both genetic predisposition and immunity of the patient. Further and broader studies are needed in the Amazon region to clarify the relationship between EBV and Hodgkin's disease.

1 INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS DE EPSTEIN BARR

Entre os agentes virais associados a processos neoplásicos, destaca-se o vírus de Epstein Barr (EBV), pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, sendo o único representante desta subfamília que tem particularidade em infectar humanos (Gratama & Ernberg, 1995). O EBV é o agente etiológico da mononucleose infecciosa; doença linfoproliferativa de evolução aguda, descrita no final do século XIX como febre ganglionar aguda.

1.1.1 Breve histórico

Em 1920, Sprunt & Evans, designaram o termo mononucleose infecciosa para o curso clínico com regressão espontânea de um caso de leucemia aguda com presença de células blásticas; no mesmo período Downey identificou as alterações morfológicas nos linfócitos; e posteriormente, em 1932, Paul e Bunnell observaram que os anticorpos humanos se aglutinavam às hemácias de outras espécies animais – anticorpos heterófilos – permitindo elevada precisão diagnóstica (Rickinson & Kieff, 2007).

No final dos anos 1950 foi descrito pela primeira vez um linfoma que incidia principalmente em crianças em certas regiões na África (Burkitt, 1958).

O EBV foi originalmente descrito por Epstein e colaboradores (1964) a partir de investigações realizadas em cultivo *in vitro* de amostras suspeitas de linfomas enviadas por Burkitt, nos quais através da microscopia eletrônica, foi possível identificar a presença de um vírus com morfologia típica dos vírus do grupo Herpes.

Coube a Henle & Henle (1966) a utilização da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) nos primeiros estudos soroepidemiológicos com EBV. Em 1968, com base no soroconversão, esses autores descreveram a associação do vírus à mononucleose infecciosa, achado que, posteriormente, seria confirmado por outros estudos (Candeias & Pereira, 1970; Wolf *et al.*, 1984).

Segundo relato de Henle e colaboradores (1969) o EBV foi identificado como sendo o agente etiológico da mononucleose infecciosa, doença que apresenta como manifestações clínicas principais: febre, faringite e linfadenomegalia. Quanto ao período de incubação, Rickinson & Kieff (2007) descreveram que este pode variar de quatro a seis semanas antes do aparecimento dos sintomas clínicos da infecção primária e que a transmissão ocorre, geralmente, pelo contato direto com as secreções de orofaringe ou indiretamente por manipulação de objetos pessoais contaminados pelo agente viral.

Estudos prévios em países industrializados mostraram que a infecção primária pelo EBV geralmente se manifesta na adolescência; e quando ocorre na fase adulta, pode cursar como uma doença proliferativa (Evans, 1972).

Os vírus da família *Herpesviridae* – *Herpes simplex* (HSV-1 e HSV-2) *Varicela-zóster* (HHV-3), EBV (HHV-4), *Citomegalovírus* (HHV-5) e outros – têm em comum, entre si, a capacidade de causar a infecção primária, e permanecer latente e assim reativar e/ou induzir a formação de tumores (Rickinson & Kieff, 2007)

Investigações realizadas por diversos autores demonstram que o EBV pode ser transmitido por transfusão sanguínea (Gratama & Ernberg, 1995), assim como, por transplante de órgãos (Crawford, 2001) e secreções genitais (Crawford *et al.*, 2002).

Apesar das manifestações clínicas do EBV em geral serem autolimitadas, pode também ocorrer infecção latente que sucede a infecção primária, persistindo durante a vida do indivíduo.

Esses agentes virais são incriminados como responsáveis por diversas desordens linfoproliferativas: em pós-transplantados (Cen *et al.*, 1991; Kenagy *et al.*, 1995; Khanna *et al.*, 1995; Green *et al.* 1996; Rezk & Weiss, 2007); nas neoplasias epiteliais severas tais como: o Linfoma de Burkitt (LB) africano (Henle *et al.*, 1969); no carcinoma de nasofaringe (Raab-Traub, 1992; Busson *et al.*, 2004); e nas desordens em indivíduos imunocomprometidos (Thomas *et al.*, 1991) com predominância do tipo 2 ou co-infecção pelos tipos 1 e 2 (Sculley *et al.*, 1990).

1.1.2 Morfologia e organização genômica

A partícula viral extracelular possui diâmetro de cerca de 150-180 nanômetros (nm). Está cercada por um envelope que contém projeções

glicoproteicas externas, de cerca de 8 nm de comprimento (Figura 1). O nucleocapsídeo icosaédrico tem 162 capsômeros e abriga um genoma viral de DNA de aproximadamente 172 mil pares de bases (pb), com 60% do seu total composto de guanina e citosina; que codificam aproximadamente 100 proteínas virais (Baer *et. al.*, 1984; Cruchley *et al.*, 1997; Rickinson & Kieff, 2007).

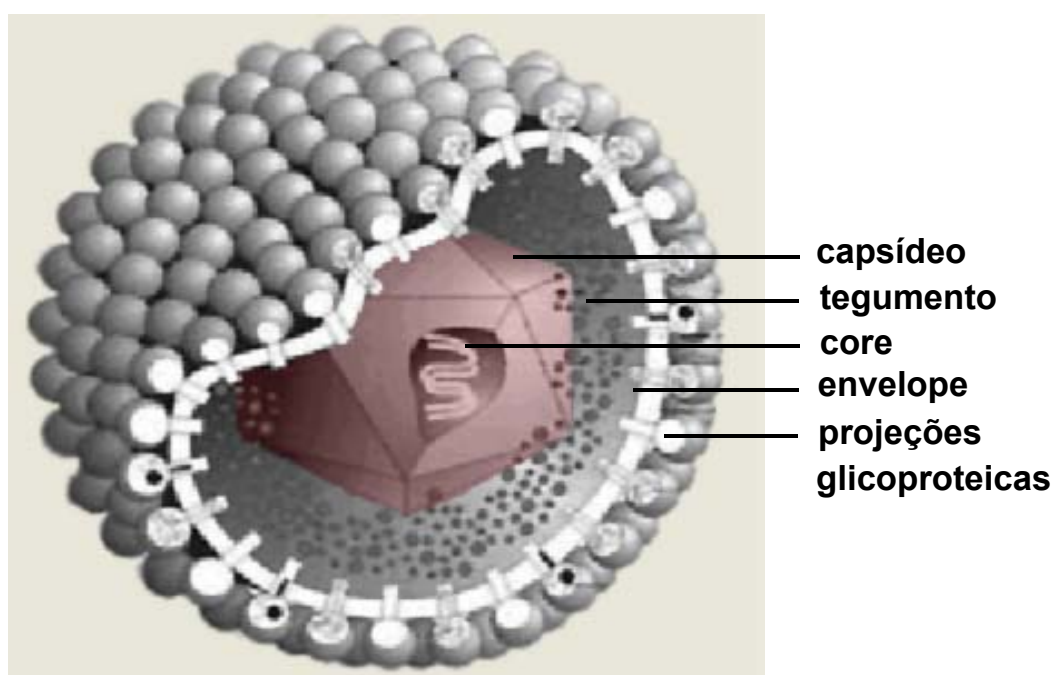


Figura 1 – Representação esquemática tridimensional dos *Herpesvírus*. (Adaptado de www.spectrosciences.com)

O genoma do EBV foi delimitado em regiões estabelecidas com base na posição dos fragmentos no mapa de restrição da endonuclease *BamHI* (*Bacillus amyloliquefaciens H*). Conforme ilustrado na Figura 2, observa-se a representação de múltiplas regiões de repetições terminais (*Terminal repeats*, TR) e várias seqüências de DNA com atividade de codificação de 6 a 12 seqüências, que servem para dividir o genoma em domínios seqüenciais longos e curtos, contendo aproximadamente 500 pb de comprimento no final de cada molécula.

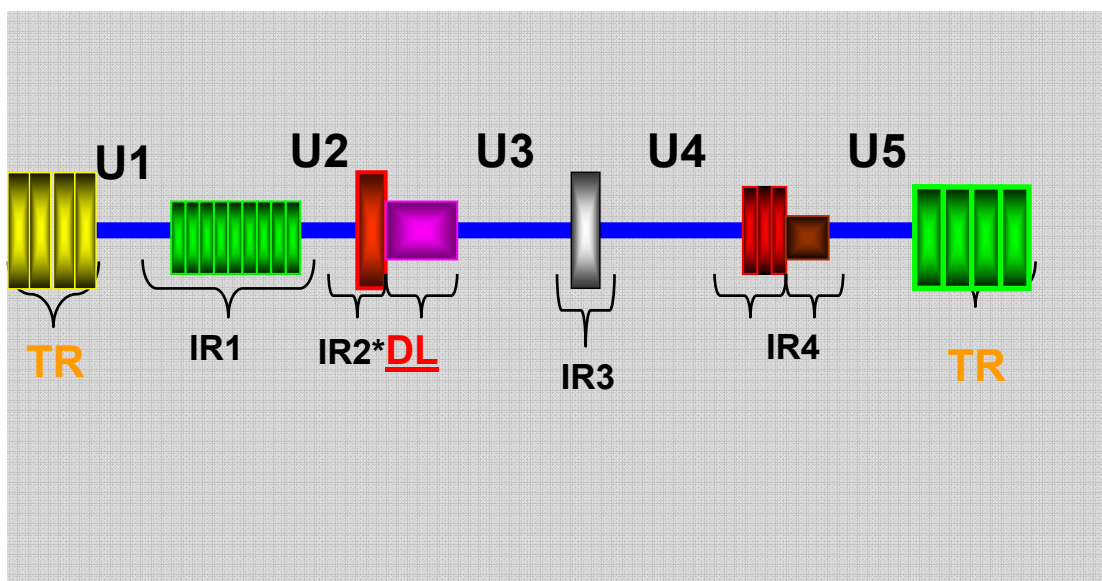


Figura 2 – Representação da estrutura do genoma do EBV. Cinco domínios compõem a sequência única (U1-U5) com seqüências diretas de repetições nas extremidades (TR) e seqüências de repetições internas (IR1- IR4). DL = deleção (Adaptado de Fields, 2007).

No interior da célula infectada, o genoma permanece circularizado por mecanismo que envolve associações ou recombinações homólogas nas regiões de TR em ambas as extremidades da molécula. A sequência U1 (única) de 15 pb possui arranjos de repetições em cadeia de 3.071 pb designada de IR1, com variação de 6,6 a 12 cópias por cepa viral.

A sequência curta U2 de certas cepas do EBV podem apresentar deleções, perdendo então a capacidade de transformar linfócitos. Outras regiões como a IR2 e IR4 apresentam sequência de repetições de 123 pb e 103 pb, respectivamente (Delecluse & Hammerschmidt, 2000).

De acordo com Rickinson & Kieff (2007) a região IR3 de 700 pb localizada na região central do genoma, é a única seqüência de DNA com repetição de GGG GCA GGA que codifica a proteína EBNA-2.

1.1.3 Diversidade genética do EBV

Dois tipos de EBV já foram isolados e caracterizados, inicialmente designados A e B com base na expressão de seqüência gênica e habilidade de transformação do linfócito B infectado (Strauss *et al.*, 1992).

Posteriormente, outros autores propuseram uma nova classificação denominando-os de tipos 1 e 2 com base na nomenclatura dos herpesvírus. A diferença entre as seqüências que codificam os Antígenos Nucleares do EBV (EBNA 2, 3A, 3B e 3C) permitem a identificação de diferentes genótipos com características epidemiológicas distintas (Cohen, 2000).

O EBV tipo 1 ocorre nas regiões ocidentais e o tipo 2, é mais frequentemente descrito na África. O isolamento viral em amostras oriundas de indivíduos portadores assintomáticos tem demonstrado que o tipo 1 é mais prevalente apresentando taxas de positividade de até 90% nos indivíduos pesquisados (Yao *et al.*, 1991, 1998; Gratama *et al.*, 1995).

Boyle e colaboradores (1993) referem que em pacientes imunocomprometidos com doença de Hodgkin foi verificada a predominância do EBV tipo 2. Outras investigações envolvendo pacientes com imunossupressão de células T e HIV positivos têm demonstrado que o EBV 2 é mais frequente nesses grupos (Sculley *et al.*, 1990; Buisson *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 1996a, 1996b, 1998).

1.1.4 Fisiopatologia

Biologicamente, os sorotipos de EBV têm a função de ativador celular, transformando *in vitro* os linfócitos B em linhagens celulares indefinidas. A adsorção do vírus à célula susceptível ocorre via receptor complementar C3d

(CR2 ou CD21) na superfície celular. Para isso é necessária a expressão da glicoproteína GP 350 de 120 kilodaltons (KDa) para que ocorra a infecção dos linfócitos B e das células epiteliais (Sixbey *et al.*, 1983). Segundo Murray & Young (2000), o EBV possui tropismo para linfócitos B e células epiteliais, podendo coexistir na forma latente e replicativa ou lítica.

A transmissão do EBV na fase aguda da doença ocorre por via oral, atingindo primeiramente as células epiteliais da orofaringe e das glândulas salivares, e, posteriormente, os linfócitos B – células-alvo do vírus (Torley-Lawson & Gross, 2004). A infecção ocorre, exclusivamente, em células do sistema linforeticular humano, caracterizando-se a infecção conforme o tipo de célula infectada.

A fixação e penetração no linfócito B são facilitadas pela glicoproteína do envelope viral denominada de GP 350; que se liga ao receptor CD 21 (molécula de superfície da célula B), que por endocitose interioriza a partícula viral (Cohen, 2000; Young & Rinckinson, 2004).

O EBV pode ser capaz de infectar populações de linfócitos B auto-reativos, perpetuando sua presença em tais células, além de causar sua expansão mediante a indução de proliferação e diferenciação celular. Torley-Lawson (2001) descreve que geralmente os linfócitos T citotóxicos são capazes de eliminar linfócitos B infectados pelo EBV, durante o processo de replicação celular. A persistência de linfócitos B infectados pelo EBV, bem como a presença de linfócitos T auto-reativos poderia decorrer de uma falha no mecanismo de apoptose.

Van Parijs & Abbas, (1996) reforçam que o sistema Fas/Fas-ligante é um mecanismo para manutenção da tolerância periférica, ou seja, que é capaz de

induzir apoptose em linfócitos anormais presentes na circulação. Os linfócitos B infectados pelo EBV geralmente não são destruídos por linfócitos T e por células Natural Killer (NK) podendo permanecer em repouso ou replicar, sem serem eliminados por meio destas células. É provável que a regulação negativa da proteína classe I do complexo principal de histocompatibilidade ou MHC nas células infectadas, seja um dos principais responsáveis pelo mecanismo de escape de sua destruição (LI *et al.*, 1995)

Após a penetração do vírus a célula segue a ocorrência de duas possíveis formas de infecção denominadas de infecção lítica e infecção latente (Rickinson & Kieff, 2007).

1.1.4.1 Infecção lítica

Durante o processo lítico o DNA do EBV incorpora-se ao genoma do linfócito, sendo transcrito e replicado no núcleo. O primeiro gene a ser expresso é o BZLF (*Left-ward open reading frame 1, BamHI Z*) que age como gatilho para a replicação viral o que resulta na produção de outras proteínas como BHRF1 (*Right-ward open reading frame 1, BamHI*), que é responsável pela produção da enzimas DNA-polimerase e timidina-quinase. Outras proteínas são produzidas, tais como os antígenos do capsídeo viral (*Capsid viral antigen, VCA*), antígenos precoces (*Early antigen, EA*) capazes de romper células latentemente infectadas pelo EBV e iniciar a replicação viral lítica (Rickinson & Kieff, 2007).

Após 24 horas da infecção do linfócito pelo EBV é possível detectar *in vivo* a presença de anticorpos para os antígenos EA e VCA.

Portanto, o ciclo lítico é caracterizado por intensa transcrição e replicação de DNA, e pela produção de proteínas conforme Figura 3.

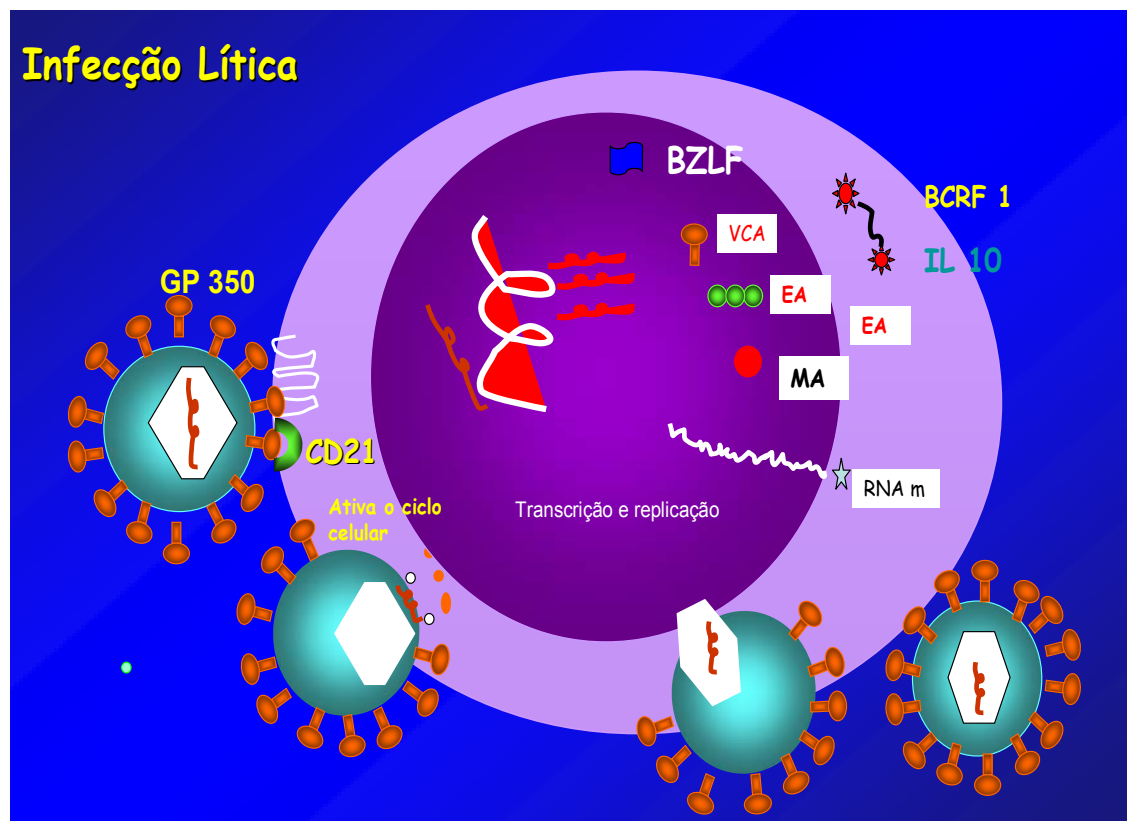


Figura 3 – Produtos da infecção pelo EBV na célula humana, expressão de BZLF-1 (Zebra) no ciclo lítico. (Fonte: <http://www.scielo.br.>).

1.1.4.2 Infecção latente

Após a infecção inicial, o DNA do EBV permanece no núcleo do linfócito como DNA epissomal, circular. Em infecções *in vitro* ocorre a transformação dos linfócitos B em linhagens linfoblásticas de crescimento permanente com expressão de cerca de dez genes do ciclo latente:

- a) seis proteínas de antígenos nucleares EB (*EB Nuclear antigen*, *EBNA*) *EBNA 1*, *EBNA 2*, *EBNA 3A*, *3B*, *3C* e *LP*;

- b) duas proteínas de membrana latente (Latent membrane protein, *LMP*) *LMP 1* e *2*; e
- c) duas pequenas sequências de RNA não traduzidas (*Epstein Barr encoded RNA*, *EBER*) *EBER 1* e *EBER 2*, sendo também expressas no ciclo lítico.

Esses produtos virais segundo Kieff & Rickinson (2007) mantêm a latência e estimulam o linfócito em repouso a se proliferar constantemente (Figura 4).

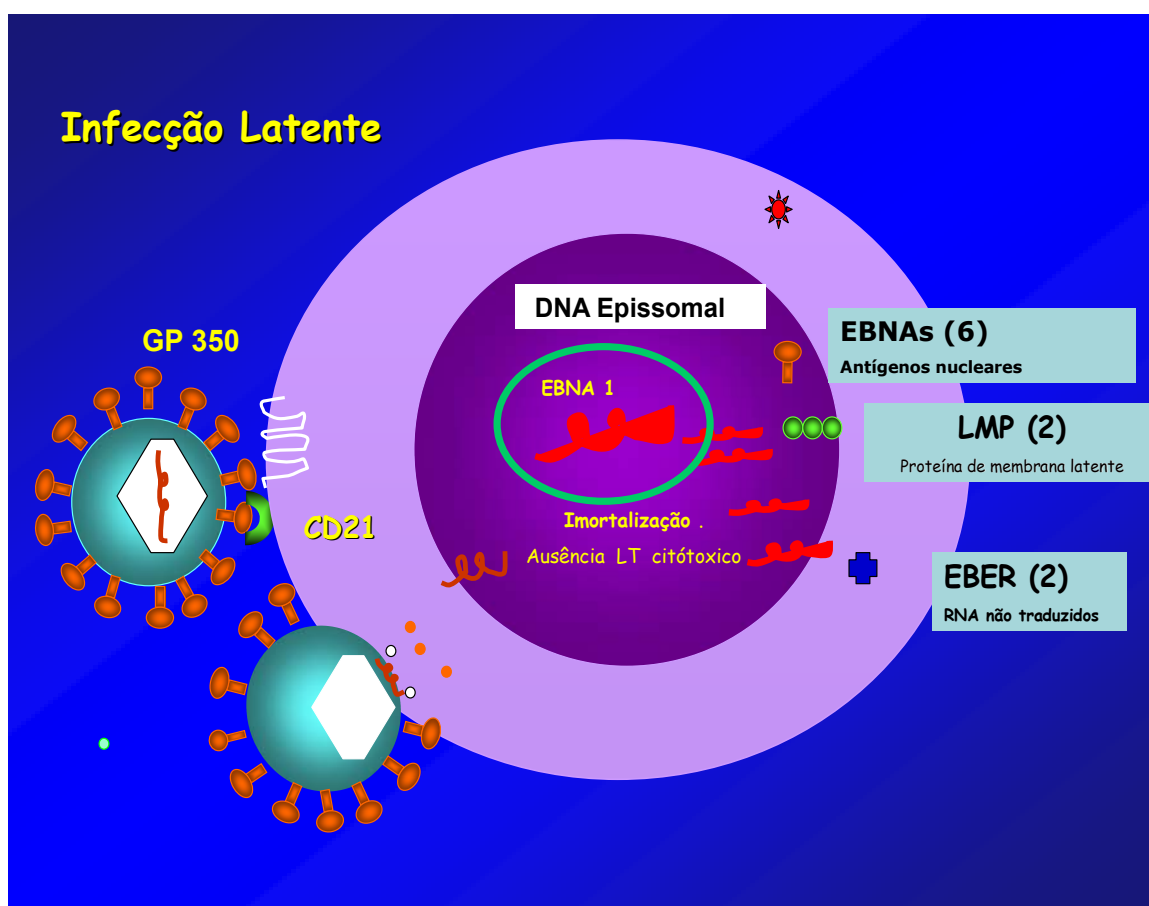


Figura 4 – Produtos da infecção pelo EBV na célula humana, produção de *EBER*, *EBNA* e *LMP* na infecção latente. (Fonte: <http://www.scielo.br>).

1.2 VÍRUS DE EPSTEIN BARR E CÂNCER

Em 1997, o EBV foi classificado pelo *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como um carcinógeno de grau 1 por causar neoplasia em humanos (Niedobitek *et al.*, 1997).

O genoma viral inserido no DNA da célula hospedeira expressa aproximadamente 100 genes, dos quais somente dez são reconhecidos na célula B infectada *in vitro*, sendo estes: dois tipos de RNA, seis proteínas nucleares, e duas proteínas de membrana. A redução dos genes expressos, durante a latência do EBV, não permite que as células infectadas sejam reconhecidas por células T citotóxicas, possibilitando a sua permanência no hospedeiro (Cohen, 2000).

As células hospedeiras com infecção viral latente induzem a proliferação sem regulação por reparo celular ou por mecanismo de eliminação de células lesadas.

Para que ocorra a transformação neoplásica é necessária a participação de dois grupos de genes: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumores.

Proto-oncogenes são genes normais responsáveis pela codificação de proteínas que intervêm na proliferação e diferenciação celulares e que, sofrendo mutações se transformam em oncogenes responsáveis pela conversão das células normais em células cancerosas.

A ação dos oncogenes não está totalmente elucidada; observações conduzidas por Wilson e colaboradores (1996) mostraram que a expressão da proteína *EBNA 1* possa atuar como um fator mutagênico. Kenecht e

colaboradores (2001) demonstraram que as células com infecção latente pelo EBV podem perder o controle levando a proliferação possivelmente associada à disfunção do sistema imunológico.

Todas as proteínas de expressão latente, com a exceção de *EBNA 1* são apresentadas pelos antígenos de leucócitos humanos (*Human Leukocyte Antigens*, HLA) e reconhecidas pelas células citotóxicas, contribuindo para a manutenção da infecção num estado suportável pelo hospedeiro (Leicht & Sugden, 2000).

No Linfoma de Burkitt, o vírus parece escapar à vigilância do sistema imune, expressando apenas o gene *EBNA 1*, com elevada replicação favorecendo a implicação do EBV, como um mitógeno de célula B, que em alguns indivíduos com tendência à disfunção do sistema imune, produz ativação policlonal dessas células ou podem originar alterações citogenéticas como as aberrações celulares. A expressão da proteína *EBNA 2* induz a ativação do ciclo replicativo do EBV e sua expressão durante a transformação neoplásica de linfócitos B. Cabe assinalar que a proteína *EBNA 3C* regula a transcrição de genes que possuem função regulatória durante a imortalização dessas células (Subramanian *et al.*, 2002).

Em outro estudo conduzido por Subramanian e colaboradores (2001) foi relatado que o *EBNA 3C* inibe a proteína supressora de metástase NM23, favorecendo a progressão maligna dos casos com metástase associada ao EBV.

Na doença de Hodgkin, o gene do antígeno nuclear 4 do EBV (*EBNA 4*) apresenta-se, geralmente, com mutação sugerindo a participação desse vírus na etiopatogênia desse linfoma (Chu *et al.*, 2001).

Estudos experimentais em camundongos transgênicos referem que a indução da proteína de membrana do linfócito (*LMP*) pode ativar as moléculas de superfície (CD40) presentes nas células B resultando em linfomas de células B. A importância da atuação oncogênica do *EBER*, região do genoma que é ativamente transcrita (até 10^7 cópias por célula) em células latentemente infectadas, está relacionada ao bloqueio ou a apoptose celular (Kulwichit *et al.* 1998).

A integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira pode causar também mutações somáticas em genes que regulam o ciclo celular, sobretudo no gene supressor tumoral p53, que quando alterado por mutação favorece o desenvolvimento de neoplasias malignas.

O padrão de latência do EBV na doença de Hodgkin tem sido associado à expressão dos genes *EBER*, *EBNA 1*, *LMP 1* e *LMP 2* (Loureiro *et al.*, 2004).

A expressão das proteínas virais do EBV no tecido linfóide parece favorecer o desenvolvimento de diferentes neoplasias, tais como: doença de Hodgkin (Elgui de Oliveira *et al.*, 2002; Gandhi *et al.*, 2004; Andersson, 2006), linfoma de Burkitt (Klumb *et al.*, 2004), carcinoma gástrico (Lopes *et al.*, 2004), carcinoma de pênis (Elgui de Oliveira *et al.*, 2004) e síndromes linfoproliferativas de células B e T (Ometto *et al.*, 1997; Liebowitz, 1998; Fachiro *et al.*, 2004).

No Brasil, no Estado de São Paulo, estudando crianças com carcinoma de nasofaringe, Paes e colaboradores (1996) observaram a presença do marcador presente no antígeno *LMP-1* (proteína de membrana do linfócito - LMP) do EBV – em percentuais de 50 a 60% – nas células tumorais que foram identificadas através de estudo imunohistoquímico.

Bacchi e colaboradores (1996), utilizando a técnica de hibridização *in situ* (HIS) demonstraram a associação do EBV com o linfoma do Sistema Nervoso Central (SNC) em 25% dos pacientes imunodeprimidos, correspondendo a 3/12 casos analisados.

No que concerne especificamente a participação do EBV na doença de Hodgkin (DH) merece destaque os achados prévios de Weiss e colaboradores (1991) que demonstraram através da *HIS* e da reação em cadeia mediada pela polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) a presença do EBV em aproximadamente, 50% dos casos de doença de Hodgkin em pacientes imunocompetentes.

1.2.1 Doença de Hodgkin

Os linfomas são neoplasias do sistema imunitário que tem origem, geralmente, em linfócitos que afetam os tecidos linfóides através do desenvolvimento de massas tumorais. Duas categorias principais indicam sua divisão em linfomas de Hodgkin e linfomas não Hodgkin.

O linfoma de Hodgkin é uma neoplasia linfoproliferativa, descrita em 1832 por Thomas Hodgkin do Guy Hospital de Londres, caracterizada

histopatologicamente pela presença de células neoplásicas com variada morfologia denominadas *Reed-Sternberg*, *RS*¹ (Hodgkin, 1832).

A clássica célula de *Reed-Sternberg* é uma célula grande, bilobada, com proeminentes nucléolos eosinófilos e está associada a um infiltrado variável de linfócitos e células inflamatórias (Figura 5).

A doença de Hodgkin tem uma característica distribuição bimodal quanto a idade. Em países industrializados o pico inicial ocorre por volta dos 20 anos e o segundo pico por volta dos 50 anos de idade. No Brasil, de acordo com Abreu (1997) no estado do Ceará, foi registrado casos da doença na faixa infanto-juvenil – 10 anos de idade – e na fase adulta em menores de 49 anos.

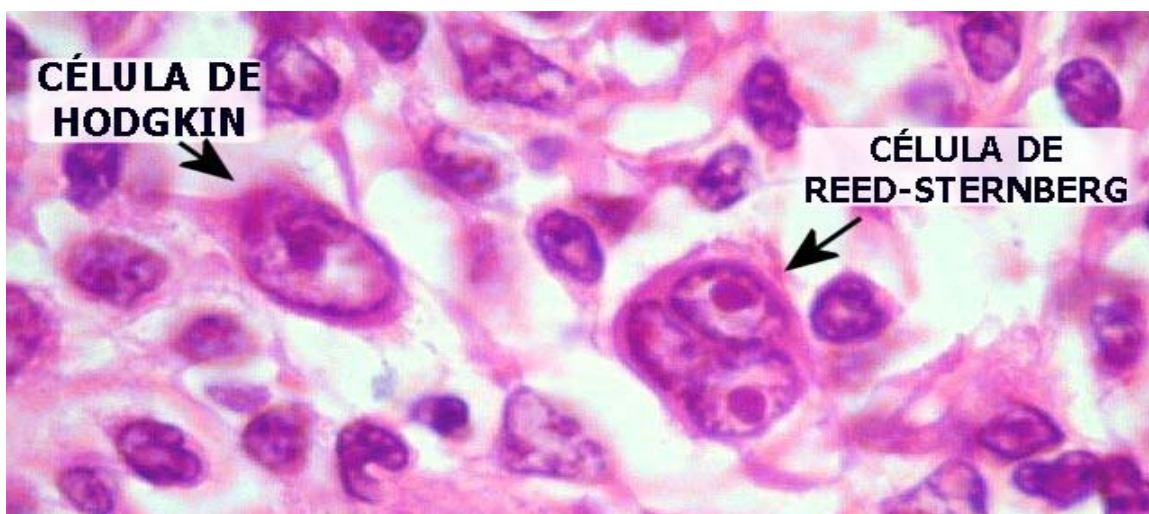


Figura 5 – Células de *REED-STERNBERG*. Caracterizada por célula binucleada com nucléolos grandes e eosinófilos, dando o clássico aspecto em olho de coruja. (Fonte: [HTTP://anatpat.unicamp.br/lamhemo11.htm](http://anatpat.unicamp.br/lamhemo11.htm)).

Todos os subtipos de doença de Hodgkin apresentam o mesmo fenótipo, as células H/RS são positivas para CD 30 (*Ber-H2*) em aproximadamente 90% dos casos, para *CD 15* (*Len-M1*) em 85% dos casos,

¹ Em homenagem aos pesquisadores Carl Sternberg e Dorothy Reed, que reconheceram pela primeira vez a presença da célula RS.

para *CD20* em 25% e negativas para *EMA* (Antígeno Epitelial de Membrana) *CD 45* e *CD 43* (Stein *et al.*, 2001).

A classificação histopatológica de Rye (1966) inclui a ocorrência de 4 grupos histológicos associadas aos subtipos de doença de Hodgkin (Quadro 1), segundo Cver, citado por Santiago (2002).

Quadro 1 – Classificação Histopatológica segundo RYE, 1966.

Subtipos de Doença de Hodgkin	Características Histopatológicas
Predominância linfocitária	Abundante infiltrado de linfócitos de aparência normal com/sem histiócitos, menos invasivo; ocasionalmente nodular com raras células de <i>Reed-Sternberg</i> (RS).
Esclerose nodular	Nódulos de infiltrado linfóide de tamanho variável, separado por feixe de colágenos e contendo numerosas células lacunares variante de células RS.
Celularidade mista	Infiltrado pleomórfico de eosinófilos, plasmócitos, histiócitos e linfócitos com numerosas células RS.
Depleção linfocitária	Escassez de linfócitos com numerosas células RS frequentemente de aparência bizarra; pode apresentar fibrose difusa ou fibras reticulares.

Fonte: <http://ioh.medstudents.com.BR/hemato9.htm>.

No Brasil, dados estatísticos registram a evolução do câncer em escala progressiva, caracterizando-se como agravo relevante em termos de

saúde pública. Relatos divulgados pelos Dados de Registros de Base Populacional (RCBP) brasileiros, INCA-Ministério da Saúde, informam que, quanto à localização primária de câncer no estado do Pará, os linfomas assumem o 5º lugar, sendo apenas precedidos por: i) câncer de colo uterino; ii) câncer de mama feminino; iii) câncer de próstata; e iv) câncer de estômago (Brasil, 2005).

1.3 VÍRUS DE EPSTEIN BARR E DOENÇA DE HODGKIN

1.3.1 Aspectos epidemiológicos

Epidemiologicamente, o EBV tem distribuição universal, com ampla dispersão em todas as populações já estudadas, incluindo, mesmo as regiões mais remotas e comunidades isoladas, como das ilhas Aleutas (Tischendorf, *et al.*, 1970), e os nativos de Nova Guiné (Lang *et al.*, 1977). Outros estudos em países desenvolvidos, como Suécia (Svedmyr & Demissie, 1968), Estados Unidos (Henle & Henle, 1967) e Inglaterra (Pereira *et al.*, 1969), assinalam que, a aquisição de anticorpos ocorre mais tardiamente em adolescentes e jovens em percentuais de 50% nos contingentes populacionais estudados.

Estudos realizados em países em desenvolvimento de clima tropical demonstraram prevalência de anticorpos anti-EBV com positividade em crianças na idade pré-escolar com taxas próximas de 100% em Uganda (Kafuko *et al.*, 1972), índice comparável ao registrado no Quênia (Henle *et al.*, 1969).

No Brasil, investigações realizadas em São Paulo registraram percentuais de positividade que variam entre 60% e 80% em crianças com até 12 anos de idade (Candeias & Pereira, 1970).

Monteiro e colaboradores (1998), demonstraram que pelo menos 70% das amostras de soro analisadas em Belém, Estado do Pará, apresentaram anticorpos *IgG* para o vírus de Epstein Barr, quer em nível ambulatorial com taxas – que variaram de 53,8% a 95,6% – quer na comunidade – 81,1% a 100% – com expressivos índices de soropositividade mesmo nas faixas etárias mais baixas.

Por outro lado, pesquisas envolvendo populações indígenas da Amazônia, como Xikrin, Tiriyó, Mekranoyti e Kaxuyana também registraram elevadas prevalências de anticorpos para esse agente, em percentuais que variam de 77% a 97% da população estudada (Black *et al.*, 1970, 1974; Monteiro *et al.*, 1995).

No que concerne a associação do EBV com a doença de Hodgkin, estudo de Weiss e colaboradores (1989) mostraram uma possível associação do EBV com a doença de Hodgkin o que foi confirmado em outros estudos em que aproximadamente 50% dos casos de doença de Hodgkin da América do Norte e Europa foram positivos para o EBV (Weiss *et al.*, 1991; Weiss & Chang, 1996).

Na América do Sul, Quênia e em parte da Ásia o EBV tem sido associado à doença de Hodgkin em 90% a 100% dos casos (Chang *et al.*, 1993; Weinreb *et al.*, 1996). Em outras áreas ou países em desenvolvimento como Honduras, Peru e outros países da América Hispânica tem sido descrito

elevada frequência do EBV em pacientes com doença de Hodgkin (Ambinder *et al.*, 1993; Gulley *et al.*, 1994; Leocini *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2007).

A associação do EBV e doença de Hodgkin podem estar relacionadas a fatores geográficos e histológicos. No Brasil, Musacchio e colaboradores (2006) descreveram que em 91% dos casos examinados foi possível identificar por PCR o DNA do EBV no plasma de pacientes com doença de Hodgkin em residentes no Rio de Janeiro. Por outro lado, Abreu e colaboradores (1997) em estudo conduzido na população infantil com análise por hibridização *in situ* e imunohistoquímica (IHQ) demonstraram um provável fator patogênico no desenvolvimento da DH infanto-juvenil no Estado do Ceará, particularmente para o subtipo de celularidade mista. Loureiro e colaboradores (2004) em estudo retrospectivo identificaram que em 55% das amostras de tecidos de DH do Rio de Janeiro havia a associação do EBV com a doença de Hodgkin analisadas por IHQ mediante a detecção de antígenos específicos na presença de anticorpos monoclonais para a *LMP 1* do EBV.

Recentemente foram descritos vários estudos empregando a técnica de PCR em tempo real, permitindo avanços significativos na detecção e quantificação de diferentes genes expressos pelo EBV (Gulley & Tang, 2008; Perkins *et al.*, 2006).

Segundo o Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS (SIA/SUS), Ministério da Saúde, a região Amazônica registrou 555 casos de linfomas durante o período de 2006 a 2007; sendo ainda ausentes dados caracterizando a associação do EBV com esses processos neoplásicos malignos na nossa região (Brasil, 2007).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Geral

Detecção do genoma do vírus de Epstein Barr em associação a casos de linfomas da região Norte do Brasil.

1.4.2 Específicos

- a) Determinar o perfil epidemiológico dos casos de linfoma de Hodgkin quanto às variáveis: sexo, idade e procedência nos casos estudados.
- b) Determinar a frequência de positividade do gene *EBER 1* do EBV por hibridização in situ por faixa etária e sexo associados à doença de Hodgkin.
- c) Determinar a positividade do gene *EBER 1* do EBV segundo os subtipos de doença de Hodgkin.
- d) Determinar a frequência de positividade do gene *EBNA 1* por PCR em Tempo Real.
- e) Comparar a positividade do gene *EBNA 1* por PCR em Tempo Real com a técnica de hibridização in situ para a detecção do gene *EBER 1* do EBV.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas (CEP/IEC) N° 0025/07 em 11 de outubro de 2007 (Anexo A).

2.1 PACIENTES

Os participantes do estudo foram 118 pacientes de ambos os sexos com diagnóstico histopatológico, confirmado de linfoma que foram encaminhados ao Departamento de Oncologia do Hospital Ofir Loyola. Os pacientes residiam em Belém e cidades vizinhas. A partir dos prontuários dos pacientes foi possível a obtenção dos seguintes dados: idade, sexo e procedência, diagnósticos histopatológicos e prováveis local de infecção primária (Anexo B).

2.2 ESPÉCIMES BIOLÓGICOS

Foram analisados 118 espécimes de tecidos linfóides obtidos por biopsias de pacientes com suspeita clínica de doença de Hodgkin, pertencentes ao acervo do Departamento de Patologia do Hospital Ofir Loyola (Hospital de Referência para Câncer na região Amazônica), diagnosticados no período de 1996 a 2005.

2.3 MÉTODOS LABORATORIAIS

2.3.1 Hibridização *in situ*

Os cortes histológicos parafinizados foram analisados pelo procedimento de HIS para a detecção do gene *EBER 1* do EBV, utilizando uma sonda conjugada à fluoresceína, com revelação por imunofluorescência que são expressos em células latentemente infectadas.

O teste de HIS é um método específico para demonstrar a presença do EBV nos espécimes biológicos obtidos de biópsias. Basicamente, detecta seqüências específicas de ácidos nucleicos pela formação de um *duplex* no fragmento de ácido nucleico de fita simples modificado (sonda) e sua seqüência complementar no espécime estudado.

A execução da técnica envolve basicamente três etapas:

- a) pré-tratamento – Na qual o procedimento de desparafinização é processado;
- b) desnaturação/hibridização; e
- c) visualização – em que é realizada uma contra coloração específica, seguida do exame em microscopia de luz.

Todas as recomendações e composição das soluções, foram utilizadas segundo sugestão e orientações contidas nos *kit* da “Clark LaboratoriesTM”, fabricado no Reino Unido - Inglaterra (Anexo C).

2.3.1.1 Pré-tratamento

As lâminas foram mergulhadas em xilol por duas vezes, com 3 minutos de duração cada. A seguir, processo semelhante foi realizado utilizando-se etanol a 99% e a 95% e água destilada. Em seguida, foram adicionados a cada lâmina 100 microlitros (uL) de proteinase K, e incubação a 37° C por 30 minutos, e depois mergulhadas em água, etanol a 99% e etanol a 95% por duas vezes por 3 minutos cada.

2.3.1.2 Hibridização

Foram adicionados 20 uL da sonda de hibridização sobre as lâminas correspondentes a cada paciente, cobertos com lamínulas de 18X18 mm, evitando-se a formação de bolhas. Em seguida, as lâminas foram colocadas em câmara úmida para incubar em estufa a 37° C por 2 horas.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas por três vezes com solução de *Tris-buffered saline* (TBS).

2.3.1.3 Detecção

Em cada lâmina, foram adicionados 100 uL de solução bloqueadora seguindo-se de incubação de 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado soro de coelho (conjugado *Rabbit F(ab') anti-FFITC/AP*) e incubados por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas por duas vezes com TBS por 3 minutos. As lâminas depois de incubadas por 5 minutos na solução tampão do substrato, receberam a adição de 1 uL de inibidor (*Levamisole*) para cada mL de enzima substrato. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente sem presença de luz por 12 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

Finalmente, foi processada a montagem das lâminas em resina sintética e realizada visualização e análise em microscópio óptico (*WILD MPS 52, Leica, Suíça*).

2.3.2 PCR em Tempo Real

O método determina a quantidade inicial de um produto (DNA) através do comportamento da cinética de amplificação nas diferentes fases ao longo dos ciclos de uma PCR, ou seja, detecta e quantifica, em tempo real, ácidos nucleicos enquanto são amplificados, sem a necessidade de realizar purificação e análises adicionais.

A cinética de amplificação é dividida em 3 fases:

- a) fase geométrica: caracterizada por apresentar alta precisão na amplificação do número de moléculas da reação;
- b) fase linear: na qual a taxa de produção de novas cadeias de DNA via PCR passa gradualmente de uma progressão geométrica para progressão linear;
- c) fase de platô: em que a eficiência de amplificação cai drasticamente para níveis insignificantes, com baixa ou nenhuma produção de novas moléculas de DNA;

2.3.2.1 Pré-tratamento das amostras de tecido fixado em parafina

- a) colocar em um microtubo de 1,5 mL, a porção de 5 cortes de tecidos, obtidos com micrótomo de tecido de aproximadamente 10 μm ;
- b) adicionar 1 mL de *n-octano* ou *xilol*;
- c) agitar constantemente em agitador mecânico por 30 minutos a 56°C;
- d) centrifugar em microcentrífuga a 14.000 *rpm* durante 5 minutos;
- e) remover cuidadosamente o sobrenadante e descartá-lo, sem tocar no sedimento.
- f) adicionar banho com:
 - 1 mL de etanol (ETOH) a 100%;
 - 1 mL de álcool (95%) ambos a temperatura ambiente;
 - 2 banhos com água deionizada
- g) centrifugar em microcentrífuga a 14.000 *rpm* durante 5 minutos;
- h) remover cuidadosamente o sobrenadante e descartá-lo, sem tocar no precipitado; e
- i) deixar evaporar o sedimento por 12 horas.

2.3.2.2 Extração do DNA

Após o processo de desparafinização foi realizada a digestão enzimática com proteinase K (200 µg/mL) a 56°C, durante 20 minutos.

Depois foi realizada a extração do ácido desoxirribonucléico (DNA) pelo método fenol-clorofórmio preconizado por Maniats e colaboradores (1989), seguindo-se as seguintes etapas:

- a) foram adicionadas às amostras: fenol saturado (1 volume da amostra para 1 volume de Fenol), homogeneizando-se a solução durante 10 segundos em agitador de tubos do tipo vortex. Em seguida, o material foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 13.000 rotações por minuto (rpm);
- b) a fase aquosa (superior) foi transferida para um tubo ao qual se acrescentou clorofórmio/álcool isoamílico (na proporção 1:1), agitando-se por 10 minutos, tendo em seguida sido submetida a uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos. A fase aquosa obtida foi novamente transferida para outro tubo;
- c) nesse tubo, para precipitação do DNA foi adicionado acetato de sódio 3M, pH 6,0 (10% do volume da amostra) e etanol absoluto gelado (2,5 X o volume da amostra), misturando-se o conteúdo por inversão. Posteriormente,

- o tubo foi incubado em um freezer à temperatura de -70°C, durante 2 horas;
- d) a seguir, o material foi centrifugado por 20 minutos a 4°C. O etanol foi separado do sedimento (DNA) por aspiração com auxílio de uma pipeta;
 - e) o sedimento foi seco em bomba de vácuo e resuspenso em 50 µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA); e
 - f) o DNA foi mantido em freezer a -20°C até seu processamento.

2.3.2.3 Identificação do gene *EBNA 1* por PCR em Tempo Real

- a) antes de iniciar é necessário, retirar e descongelar os tubos com as amostras de que serão analisadas;
- b) os tubos contendo *AmpliMaster*, *AmpliMix* e *AmpliProbe* foram descongelados, centrifugados por 30 segundos e mantidos em gelo seco;
- c) foram transferidos 100 uL de *AmpliMIX* e 100 uL do *AmpliProbe* para o tubo contendo 100 uL de *AmpliMaster*; que foi agitado por vortex e centrifugado por 5 minutos;
- d) foram transferidos 20 uL da reação obtida (*AmpliMix*, *Ampliprobe* e *Amplimaster*) para cada orifício da placa de

reação de amplificação conforme protocolo específico do teste.

- e) adicionou-se 5 uL do DNA extraído.
- f) como controle negativo foi adicionado 5 uL de Água.
- g) acrescentou-se 5 uL de *AmpliStandard* com 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 de cópias;
- h) para a obtenção da curva padrão foi preparada uma série de reações usando DNA que codifica a proteína *EBNA 1* (cópias nas quantidades 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2).
- i) a placa de amplificação foi lacrada com lâmina adesiva de amplificação.
- j) colocou-se a placa de amplificação no termociclador *Applied Biosystems ABI PRISMTM* (*Applied Biosystems, CA, US*) da série 7000 sendo programado para utilizar placas com 96 orifícios.

Para a análise do gene que codifica a proteína *EBNA 1* do EBV e o gene da betaglobina humana foram empregados uma mistura de sondas fluorescentes marcadas com Fluorófilos FAM e VIC e bloqueada por um grupo MGB-NFQ, respectivamente.

2.3.2.3.1 Interpretação dos resultados

O valor de fluorescência emitido pela sonda específica para o EBV nas reações de amplificação dos quatro DNA padrão foram utilizados para calcular a curva padrão (*Standard Curve*) da sessão de amplificação.

O valor limiar (*Threshold*) de fluorescência do controle negativo do EBV no teste foi indeterminado validando a detecção dos espécimes pesquisados.

Este experimento foi utilizado para a dosagem quantitativa de moléculas de DNA do gene que codifica a proteína *EBNA 1* de EBV para reações de amplificação correspondentes aos genomas equivalentes por reação entre 1.000.000 e 10 cópias.

Foram realizados quarenta e cinco ciclos de amplificação para as etapas de desnaturação, anelamento e alongamento descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Fases de amplificações para a quantificação do gene *EBNA1* do EBV.

Fases	Temperaturas	Tempo
Descontaminação	50°	2 min
Desnaturação / anelamento	95°	10 min
	95°	15 seg
	60°	1 min

As médias dos valores do CT (*Cycle Threshold*) de cada reação resultaram em uma curva padrão (valor de CT pelo nº de cópias virais), com coeficiente de correlação linear (R^2) no valor de 0,99 a 1,00, como parâmetro de validação do teste segundo *Kit de Real Time PCR (Nanogen Advanced Diagnostics)*.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram processados, essencialmente, com o recurso do Software EPI INFO/versão 6.0 (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC - Atlanta, Georgia, EUA*) e *BioEstat 5.0*. (Ayres *et al.*, 2007). As médias aritméticas, desvios padrões e medianas dos grupos amostrais foram estimados para as diferentes categorias analisadas.

- A comparação entre idade, diagnóstico e prevalência dos tipos de linfomas foi realizada utilizando-se o teste t de *Student* e os valores de p menores que 0,05 no intervalo de confiança de 95% foram considerados estatisticamente significantes.
- As comparações das variáveis entre os grupos de pacientes com doença de Hodgkin foram estimadas utilizando-se o teste exato de Fisher.

3 RESULTADOS

Foram analisadas 118 amostras de tecido linfóide (blocos parafinados) pelo procedimento de HIS, com idade dos pacientes variando de 2 a 98 anos (média de 34,3 anos). Quanto à distribuição por sexo, 72 (61%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 46 (39%) ao feminino, perfazendo uma razão masculino:feminino de 1,56:1 (Figura 6).

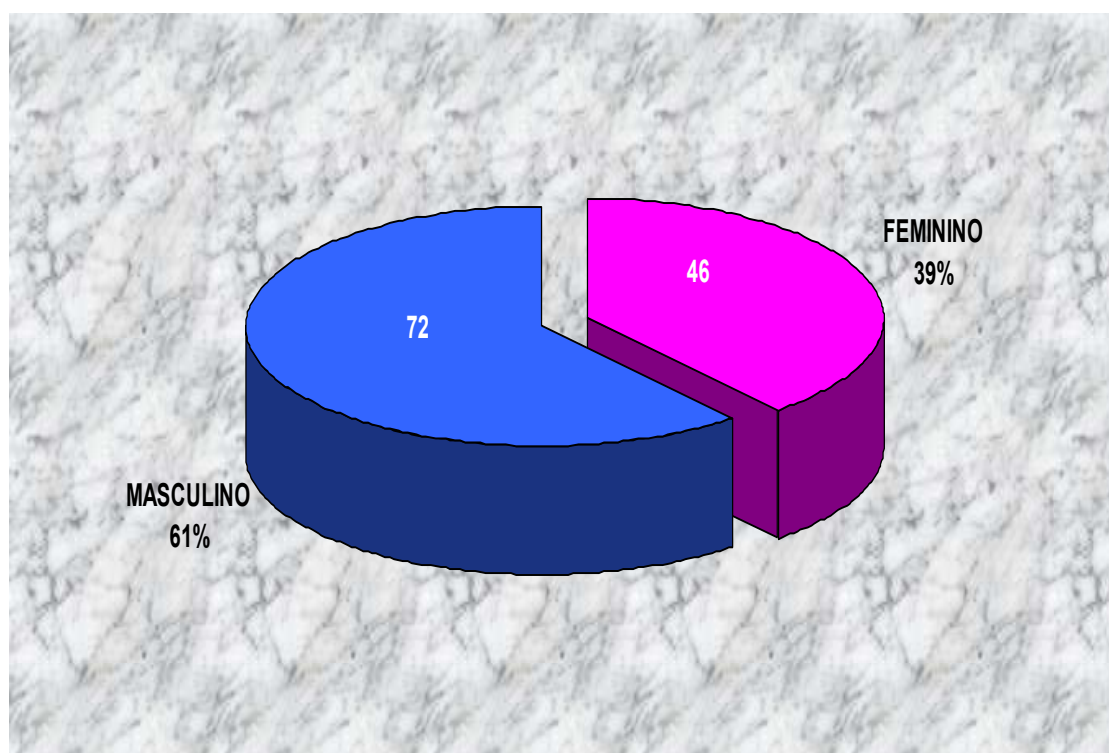


Figura 6 – Distribuição por sexo dos casos de linfomas diagnosticados no período de 1996 a 2005.

Quanto à procedência dos casos de linfomas analisados, registramos que não foi possível a identificação da procedência nas fichas epidemiológicas de 16 casos o que representou ausência de informação em 13,5% (16/118) dos pesquisados. Dos 102 casos que se identificou a

procedência 61,8% (63/102) foram procedentes da área metropolitana de Belém e 24,5% (25/102) de vários municípios do Estado do Pará tais como: Altamira, Primavera, e Santa Bárbara com dois casos; Abaetetuba, Benevides, Benfica, Bragança, Castanhal, Concórdia do Pará, Irituia, Itaituba, Limoeiro de Ajuru, Marajó, Marituba, Mosqueiro, Oeiras do Pará, Paragominas, Santa Izabel, Santarém, Terra Alta, São Felix do Xingu e Vizeu com um caso; sendo que Ananindeua registrou expressiva taxa com 13,7% (14/102) dos casos (Figura 7).

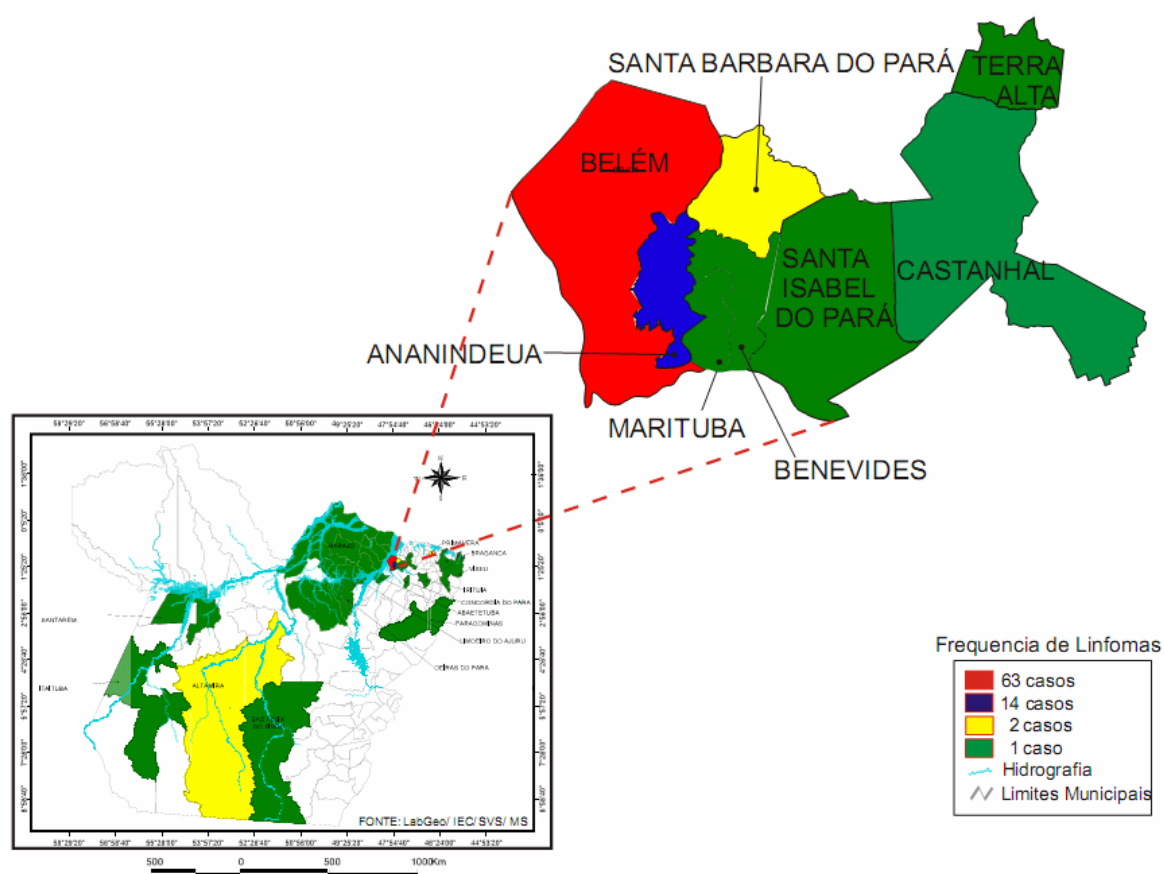


Figura 7 – Procedência dos casos de linfomas pesquisados no período de 1996 a 2005. Fonte: Laboratório de Geoprocessamento/IEC/SVS/MS.

A idade dos pacientes variou de 2 a 98 anos com média de idade de 32,6 anos. As freqüências de 32,2% (38/118), 19,5% (23/118), 20,3% (24/118) e 27,9% (33/118) foram observadas para as faixas etárias de 0-15, 16-30, 31-45 e > 45 anos, respectivamente (Figura 8).

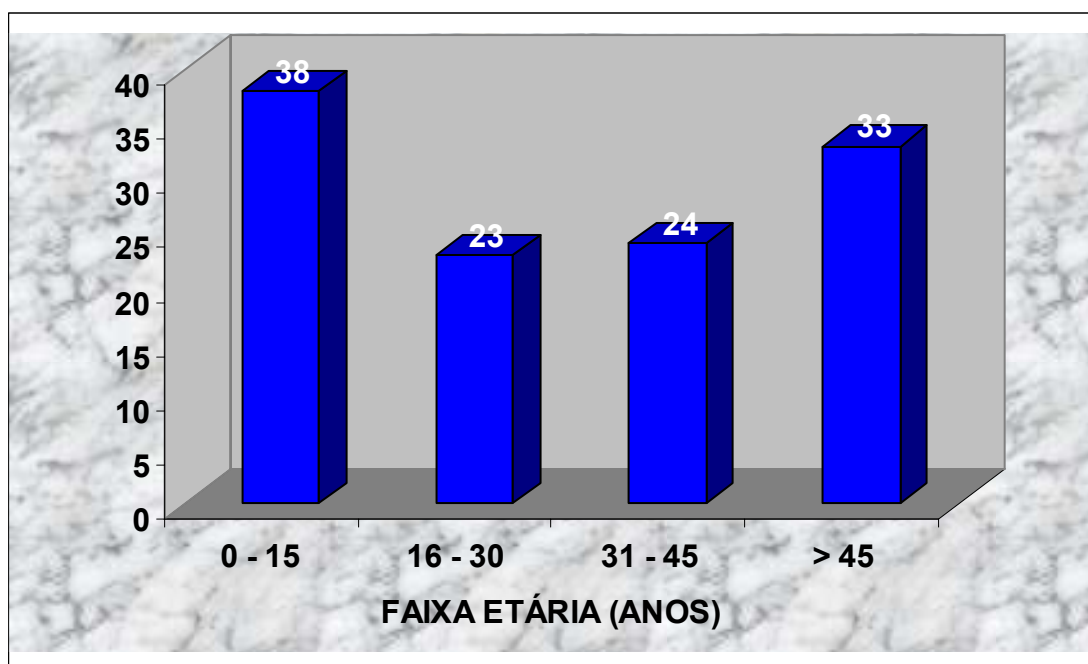


Figura 8 – Distribuição dos casos de linfomas (n=118) por faixa etária no período de 1996 a 2005.

O diagnóstico histopatológico dos 118 casos foi realizado pelo Departamento de Patologia do Hospital Ofir Loyola, dos quais 55% (65/118) foram classificados como doença de Hodgkin e 45% (53/118) de linfomas não Hodgkin (Figura 9).

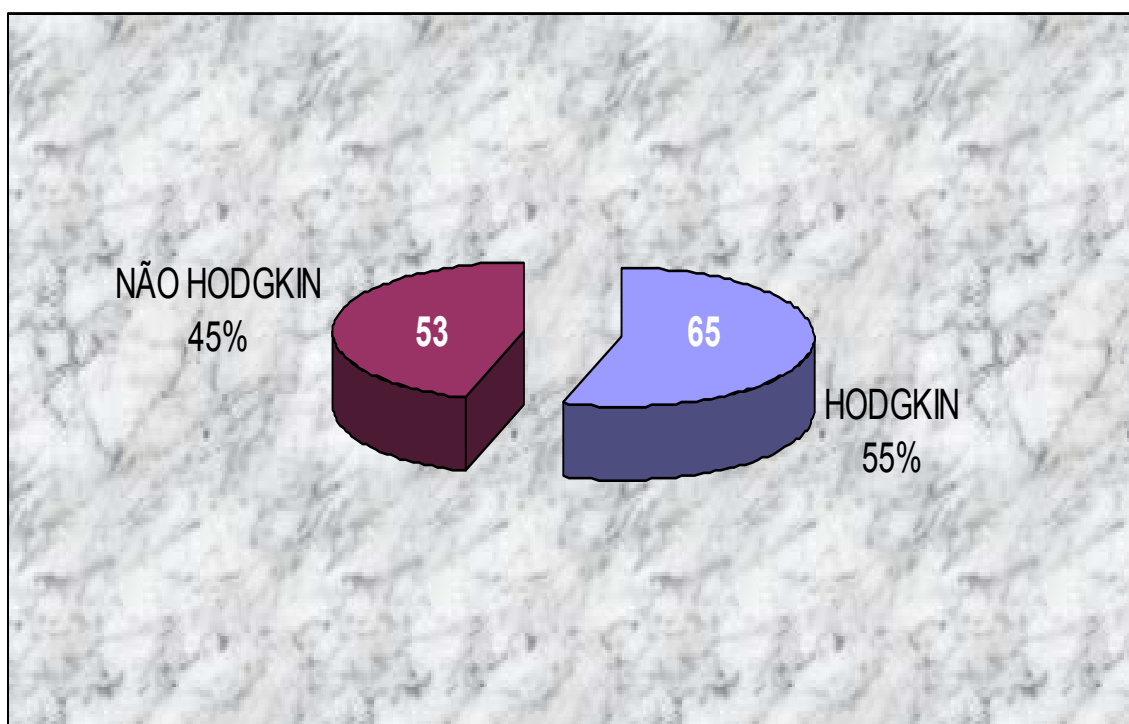


Figura 9 – Distribuição dos tipos de linfomas diagnosticados (n=118) no Departamento de Patologia do Hospital Ofir Loyola, no período de 1996 a 2005.

Todos os anos da série estudada (1996 a 2005) apresentaram casos de linfomas. No entanto, a distribuição de casos por ano de estudo não foi uniforme. De fato, o ano de 2002 foi o que registrou maior número de casos diagnosticados (n=19, 16%) e o ano de 1996 foi o que apresentou menor número de casos (n=2, 2%). A distribuição completa da série com o número de casos diagnosticados por ano de ocorrência está apresentada na Figura 10.

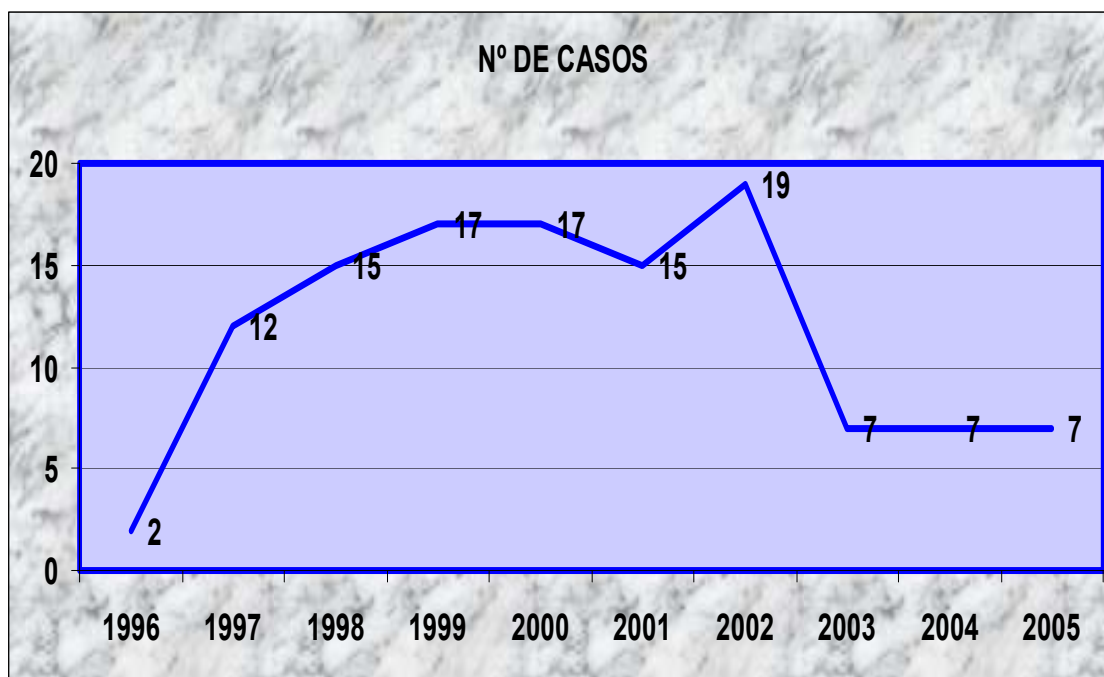


Figura 10 – Distribuição dos casos de linfomas (n=118) por ano de diagnóstico no período de 1996 a 2005.

3.1 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS

Quanto ao diagnóstico do padrão histopatológico dos 118 casos realizado no Departamento de Patologia do HOL, resultou em 53 casos (45%) diagnosticados como linfoma não Hodgkin (Figura 11) dos quais 30 (57%) foram do sexo masculino. A idade desses pacientes variou de 3 a 98 anos, com média de idade de 38,2 anos.

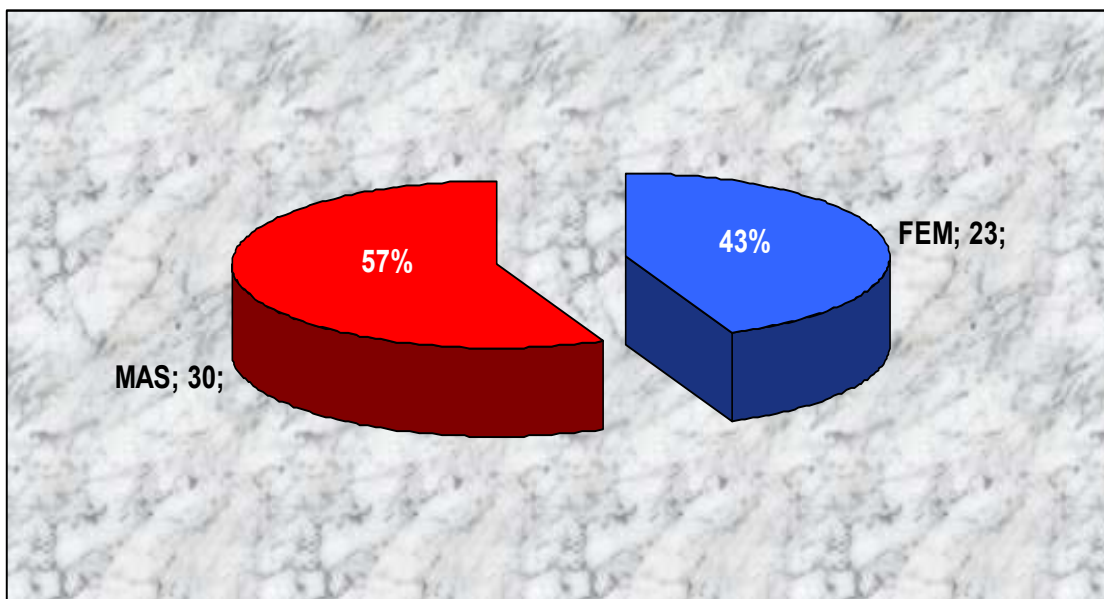


Figura 11 – Distribuição dos casos de linfoma não Hodgkin (n=53) de acordo com o sexo.

A doença de Hodgkin foi detectada em 55% (65/118) dos tecidos linfóides dos casos analisados (Figura 9). Desse total 42 pacientes (64,6%) eram do sexo masculino e 23 (35,4%) eram do sexo feminino com uma relação M:F de 1,82:1 (Figura 12).

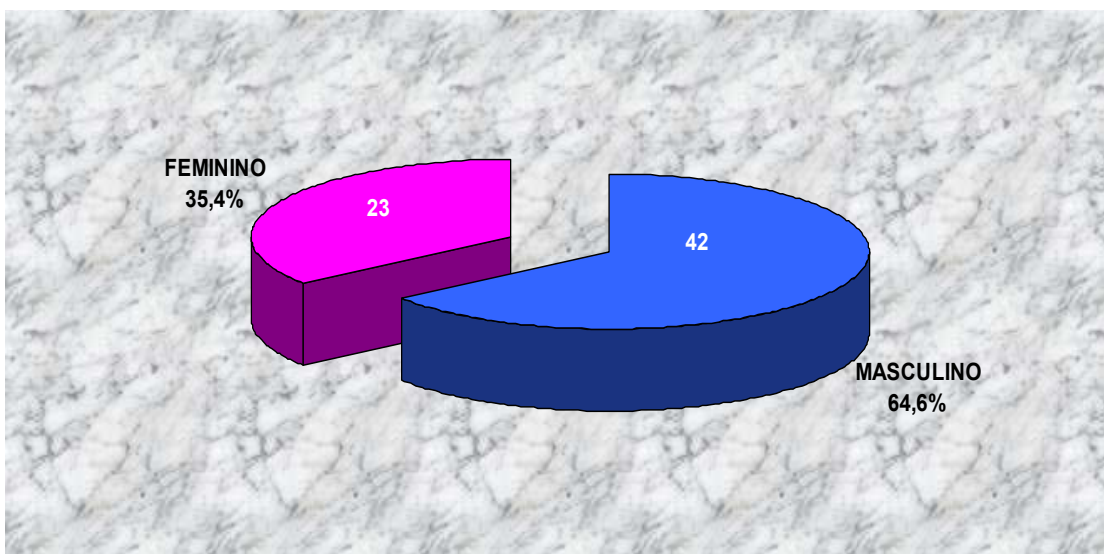


Figura 12 – Distribuição por sexo dos casos de doença de Hodgkin diagnosticados no HOL no período de 1996 a 2005.

A idade dos pacientes (n=65) com diagnóstico de doença de Hodgkin variou de 2 meses a 84 anos, com média de 28,3 anos e mediana de 5 anos (Figura 13).

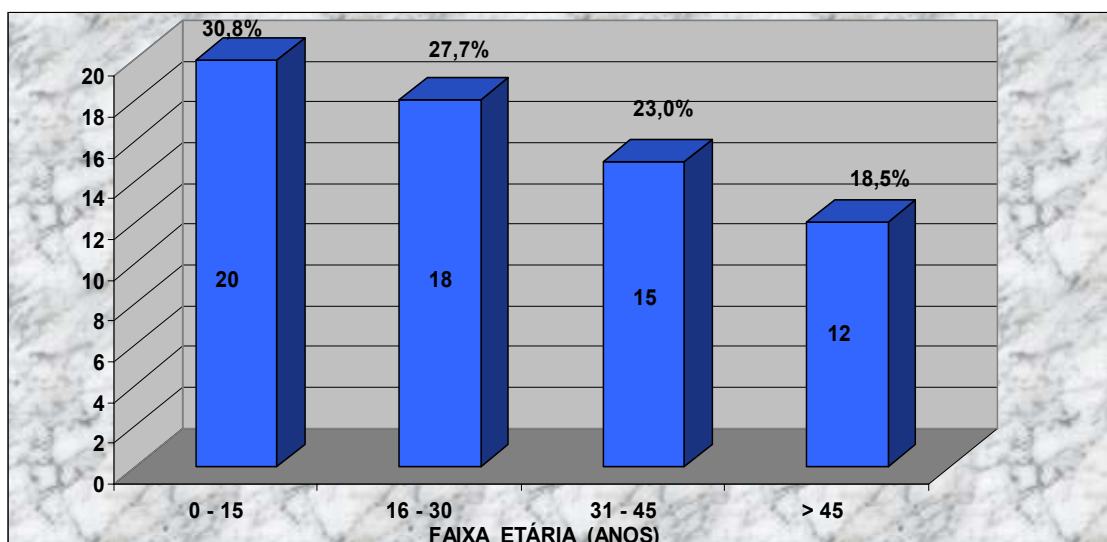


Figura 13 – Distribuição por faixa etária dos casos de doença de Hodgkin no período de 1996 a 2005.

No tocante à distribuição dos subtipos histológicos nos 65 casos diagnosticados como doença de Hodgkin estudados no período de 1996 a 2005, resultou que para 33 (50,8%) pacientes o padrão histológico foi de esclerose nodular, seguindo-se do padrão de celularidade mista com 17 (26,2%) casos, depleção linfocitária com 10 (15,4%) casos e finalmente, com menor ocorrência o padrão de predominância linfocitária com 5 (7,6%) casos (Figura 14).

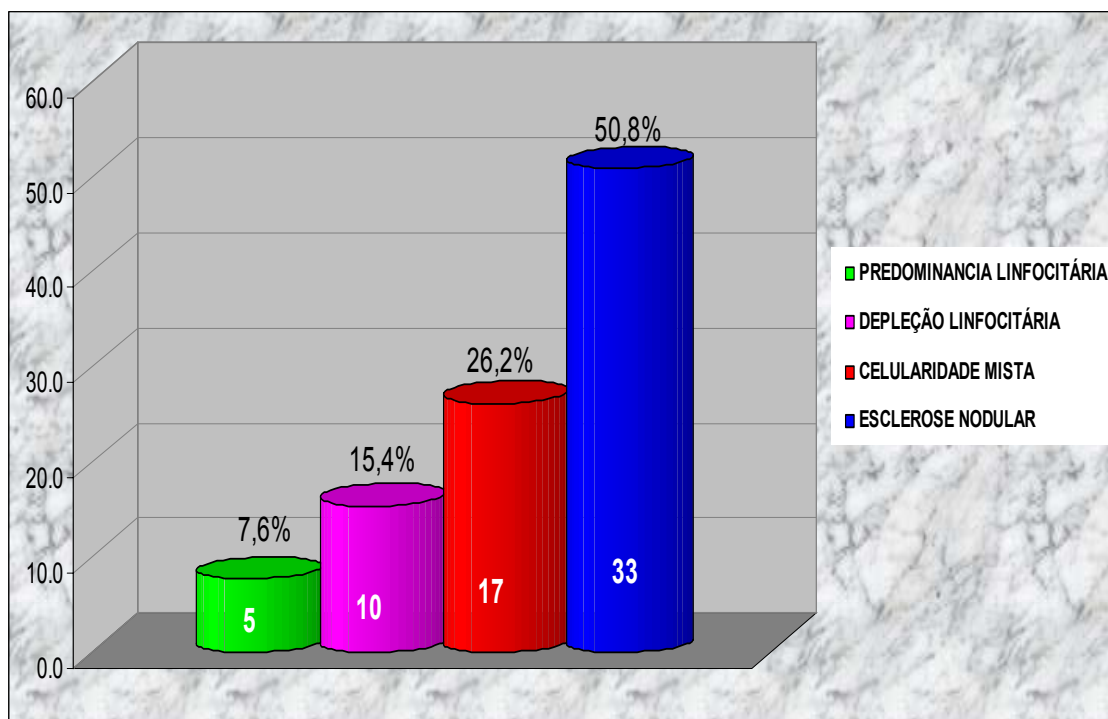


Figura 14 – Distribuição dos subtipos de DH diagnosticados no HOL no período de 1996 a 2005.

A análise de distribuição desses padrões histológicos por faixa etária nos 65 casos de DH mostrou no global, a ocorrência maior no grupo etário de 0 a 15 anos com 20 casos e com menor prevalência a faixa de idade de maiores de 45 anos com 12 casos. Sendo que na faixa de 31 a 45 anos não se observou casos histológicos no padrão de predominância linfocitária (Figura 15).

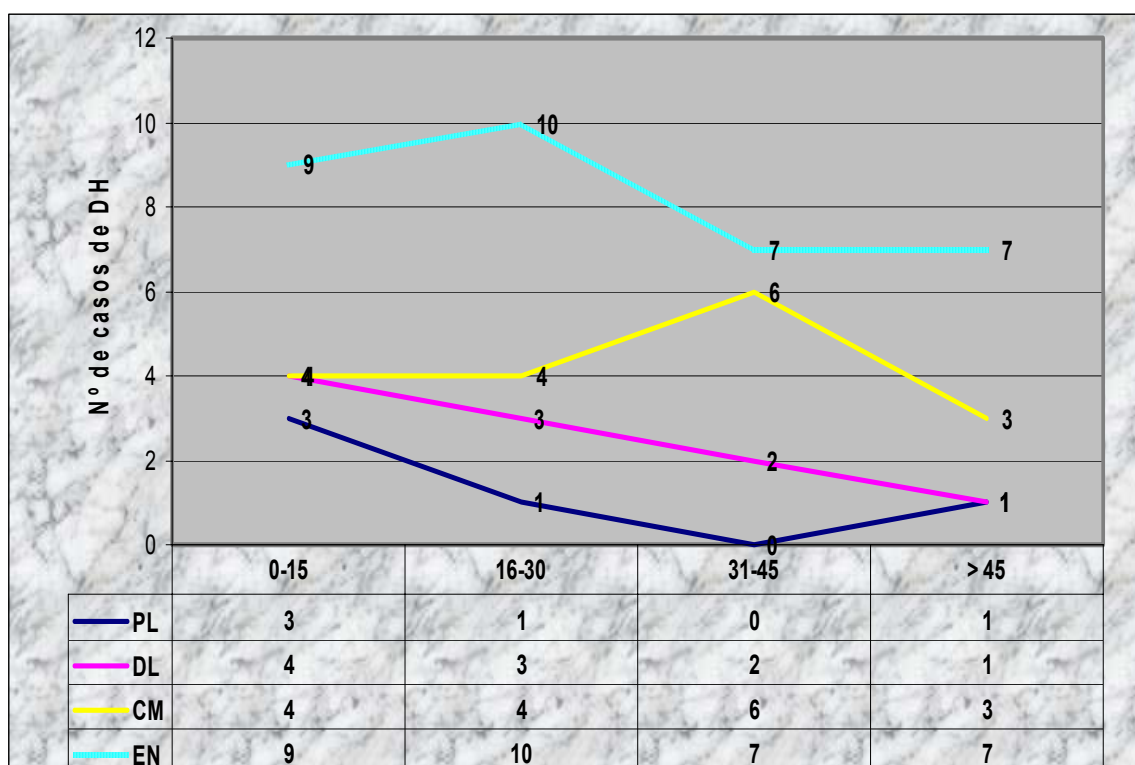


Figura 15 – Distribuição dos subtipos de DH por faixa etária no período de 1996 a 2005. (PL= Predominância Linfocitária; DL= Depleção Linfocitária; CM= Celularidade Mista; EN= Esclerose Nodular).

3.2 IDENTIFICAÇÃO DO GENE *EBER 1* DO EBV POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

A frequência global de positividade para o gene *EBER 1* do EBV nos linfomas foi de 78,8% (93/118) nos espécimes analisados. O gene *EBER 1* do EBV foi identificado em 81,1% (43/53) dos casos de linfomas não Hodgkin e 76,9% (50/65) dos casos de doença de Hodgkin, o que mostrou não resultar em diferença estatisticamente significativa ($>0,05$) quanto a presença do gene *EBER 1* do EBV nos grupos analisados.

Quanto à distribuição dos casos de doença de Hodgkin com gene *EBER 1* do EBV identificado por sexo, observou-se que 66% (33/50) e 34%

(17/50) dos investigados pertenciam ao sexo masculino e feminino, respectivamente; perfazendo uma razão masculino:feminino de 1,94:1 (Figura 16).

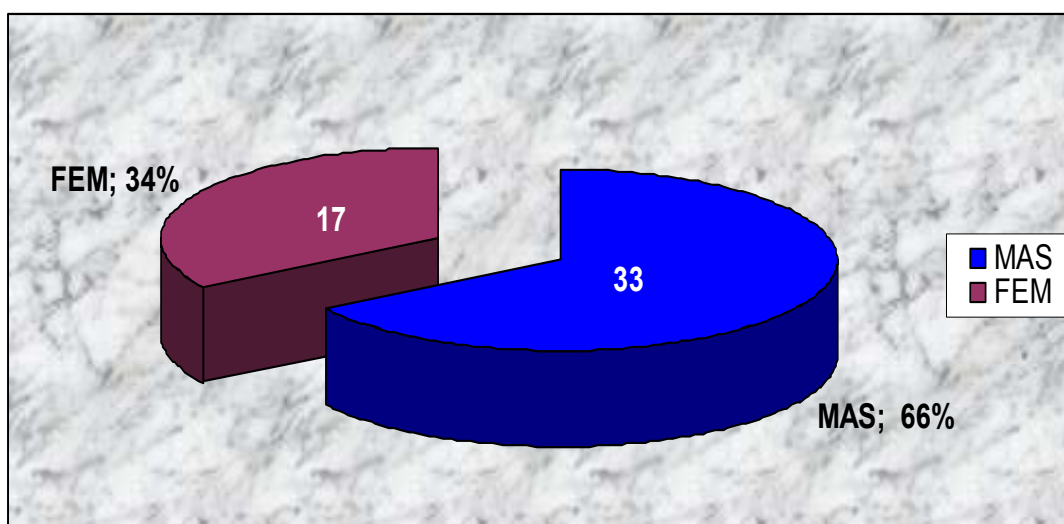


Figura 16 – Distribuição por sexo dos casos de DH/EBV positivo para o gene *EBER 1* do EBV.

As taxas de positividade para o EBV por HIS nas faixas de 0-15, 16-30, 31-45 e > 45 anos de idade foram de 28% (14/50); 28% (14/50); 26% (13/50) e 18% (9/50), respectivamente, não se observando diferença com significância estatística. A idade variou de 2 a 84 anos com média de 28,7 anos e mediana de 26,5 anos (Figura 17).

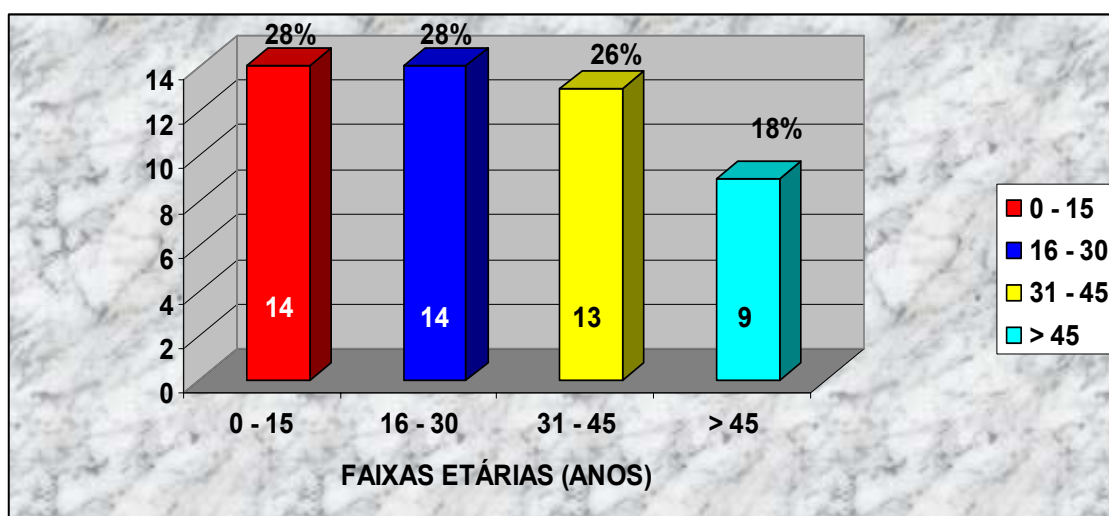


Figura 17 – Distribuição por faixa etária dos casos de doença de Hodgkin positivos (n=50) para o EBV.

Quanto à localização anatômica primária dos casos de DH positivos para o EBV, 70% localizaram-se na região cervical, 12% na região inguinal, 8% na região clavicular e 10% em outras áreas corporais (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição percentual da localização primária do tumor nos casos de DH positivos para o EBV no período de 1995 a 2006.

Localização do tumor	Nº de casos	%
Cervical	35	70,0
Inguinal	6	12,0
Clavicular	4	8,0
Baço	1	2,0
Escapula	1	2,0
Mediastino	1	2,0
Retroperitônio	1	2,0
Mandibular	1	2,0
Total	50	100,0

Quanto à procedência dos casos de DH EBV positivos 58,8% (20/34) residiam em Belém, 14,7% (5/34) procediam de Ananindeua e 26,5% (9/34) de outros municípios tais como: Limoeiro do Ajuru, Altamira, Benevides, Castanhal, Curuçá, Cametá, Mosqueiro, Oeiras do Pará e Paragominas. Em 16 casos não existiam as informações sobre a procedência dos pacientes (Figura 18).

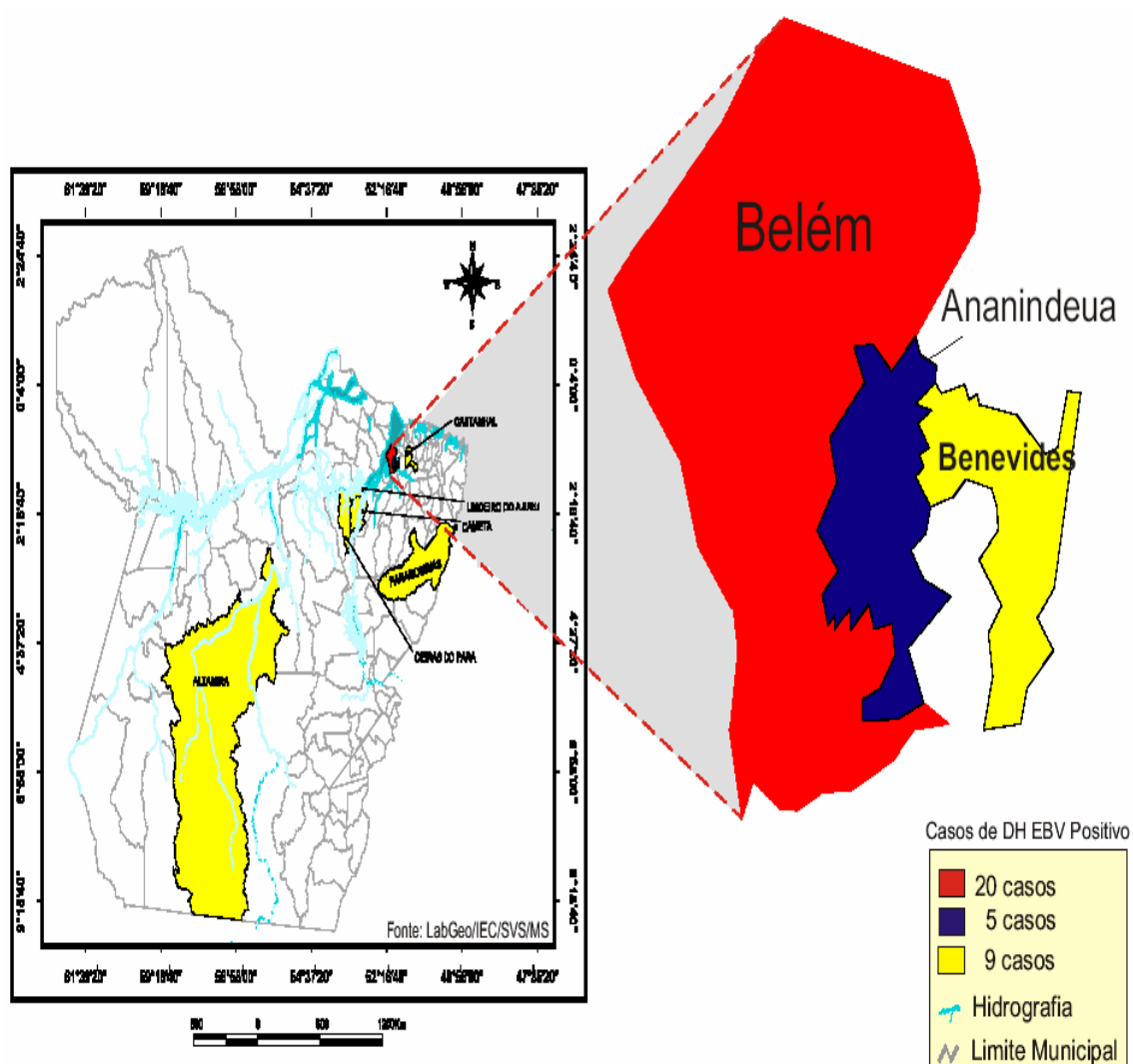


Figura 18 – Procedência dos casos DH positivos para o gene *EBER 1* do EBV no período de 1996 a 2005.

No tocante a positividade dos casos de DH para o gene *EBER 1* do EBV, a maior positividade absoluta foi no padrão histológico de esclerose nodular com 50% (25/50), no entanto, a maior prevalência relativa por sexo ocorreu para os padrões histológicos predominância linfocitária (n=3) e celularidade mista (n=10) ambos no sexo masculino com 75,0% e 71,4% dos casos, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Positividade para o gene *EBER 1* do EBV por HIS segundo os subtipos de doença de Hodgkin, 1996 - 2005.

Subtipos DH	Nº de Casos (%)			EBV + (%)		
		Fem	Mas		Fem	Mas
Predominância Linfocitária	5 (7,6)	1 (20,0)	4 (80,0)	4 (8,0)	1 (25,0)	3 (75,0)
Celularidade Mista	17 (26,2)	6 (35,3)	11 (64,7)	14 (28,0)	4 (28,6)	10 (71,4)
Depleção Linfocitária	10 (15,4)	4 (40,0)	6 (60,0)	7 (14,0)	2 (28,6)	5 (71,4)
Esclerose Nodular	33 (50,8)	12 (36,4)	21 (63,6)	25 (50,0)	10 (40,0)	15 (60,0)
Total	65 (100)	23 (35,4)	42 (64,6)	50 (100)	17 (34,0)	33 (66,0)

Quanto à faixa etária dos casos DH EBV positivos para o gene *EBER* 1 do EBV, a esclerose nodular foi mais freqüente com 25 casos, com idades que variaram de 6-84 anos (média de 28,8 anos; mediana de 26 anos) tendo prevalecido a positividade entre os menores de 30 anos com seis casos.

O subtipo celularidade mista (n=14) foi mais representativo na faixa etária de maiores de 30 anos com 8 casos (57,1%). A idade média dos casos foi de 30 anos (variando de 2-68 anos) e mediana igual a 32 anos para os investigados, que se encontram discriminados na Figura 19.

O subtipo predominância linfocitária foi mais freqüente em menores de 30 anos com três casos onde a média de idade de 21,3 anos.

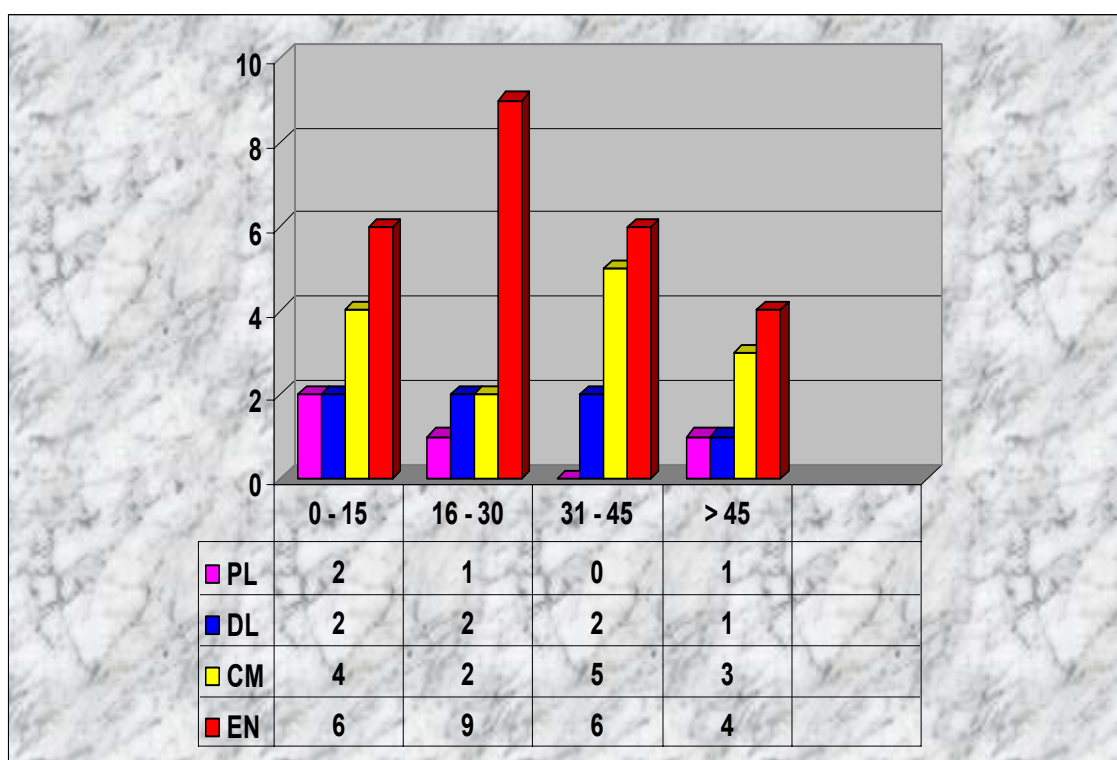


Figura 19 – Distribuição por faixa etária segundo os subtipos de DH positivos para o gene *EBER* 1 do EBV. (PL= Predominância Linfocitária; DL= Depleção Linfocitária; CM= Celularidade Mista; EN= Esclerose Nodular).

3.3 IDENTIFICAÇÃO DO GENE *EBNA 1* POR PCR EM TEMPO REAL

A curva padrão foi elaborada automaticamente pelo software *ABI 7700 Sequence Detection System* traçando a C_t valores contra cada padrão de concentração conhecida, com coeficiente de correlação linear (r^2) de 0,99 a 1,10 (Figura 20).

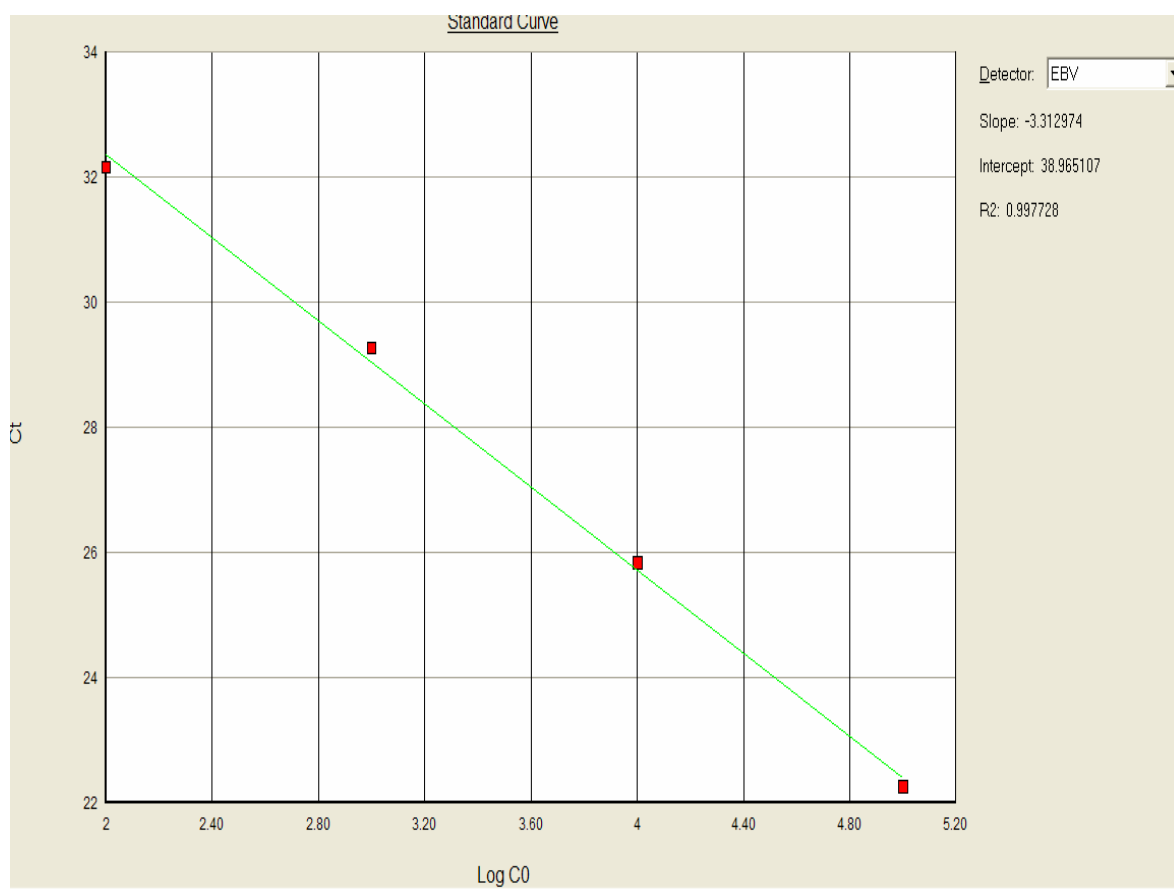


Figura 20 – Curva padrão de amplificação para cálculo da quantificação da carga viral das amostras analisadas por PCR em Tempo Real.

Quarenta e nove amostras de DH foram analisadas tanto por PCR em tempo real quanto por Hibridização *in situ*. Quanto à correlação entre a positividade para o gene *EBNA 1* do EBV por PCR em Tempo Real (26/49) e a positividade para o gene *EBER 1* por HIS (24/49), não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas metodologias avaliadas ($p=0,887$) (Figura 21).

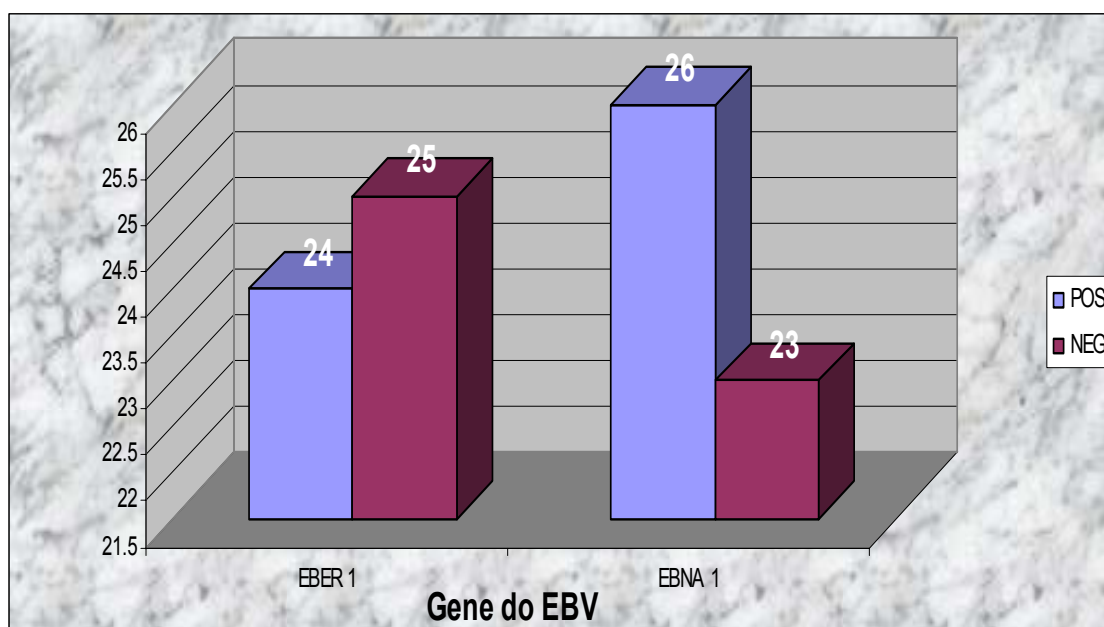


Figura 21 – Comparação entre as 49 amostras de doença de Hodgkin analisadas por Hibridização *in situ* e PCR em Tempo Real.

4 DISCUSSÃO

Em 2008, segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer IARC/OMS (*World Cancer Report, 2008*), foi estimado que cerca de 12 milhões de casos novos de câncer e 7 milhões de óbitos ocorreriam no mundo ao ano. A IARC/OMS estimou que, em 2008, metade dos casos novos e cerca de dois terços dos óbitos por câncer ocorreriam nos países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas previstas pelo Ministério da Saúde para o ano de 2010 e válidas também para o ano de 2011, apontam que são esperados ocorrer 489.270 casos novos de câncer (Brasil, 2009).

A distribuição dos casos novos de câncer segundo localização primária é bem heterogênea entre estados e capitais do Brasil; o que fica bem evidenciado ao observar-se a representação espacial das diferentes taxas brutas de incidência. As regiões Sul e Sudeste, de uma maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto que as regiões Norte e Nordeste mostram as menores taxas, já a região Centro-Oeste apresenta um padrão intermediário tendo como fatores determinantes para tais diferenças os fatores de risco, a disponibilidade de tratamento e a qualidade das práticas médicas (Brasil, 2008).

Diante deste cenário fica clara a necessidade de continuidade em investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, nos diferentes níveis de atuação, pautado para a promoção da saúde, detecção precoce, assistência aos pacientes, na vigilância epidemiológica, bem como para formação de recursos humanos, comunicação e mobilização social, pesquisa e gestão do SUS (Brasil, 2009).

Os linfomas originam-se da proliferação clonal de linfócitos B, T ou células *natural killer* (NK) que afetam frequentemente os tecidos linfóides (linfonodos, baço) e a medula óssea.

Tradicionalmente os linfomas estão divididos em linfomas não Hodgkin (LNH) e linfomas tipo Hodgkin (LD). Os achados deste estudo mostraram a ocorrência de 32% (38/118) para os casos de linfomas em menores de 15 anos, e que 20,3% (24/118) dos pesquisados tinham até 10 anos de idade; portanto com grande prevalência na faixa pediátrica.

A doença de Hodgkin possui uma característica bimodal quanto à idade. Em países desenvolvidos, Kim e colaboradores (2003) descreveram a elevada incidência de DH em adultos jovens na faixa dos 20 anos e em adultos após os 50 anos de idade. Nos países em desenvolvimento a doença geralmente ocorre na infância e adolescência (Gufferman & Delzell, 1984; Bleyer *et al.*, 2006).

A análise da frequência dos subtipos de DH em relação às faixas etárias em nosso estudo evidenciou expressiva frequência para o subtipo esclerose nodular incidindo em menores de 15 anos com taxas de 27,2% (9/33) o que revela um padrão que difere daquele estabelecido em estudos conduzidos em outros estados do Brasil para a faixa pediátrica, como segue: Bahia (Araujo *et al.*, 2006) e São Paulo (Elgui de Oliveira *et al.*, 2002) nos quais observou-se predomínio do subtipo celularidade mista.

Nesta investigação, a esclerose nodular foi o subtipo mais frequente, com mais da metade dos casos positivos, o que está em concordância com estudos conduzidos por Elgui de Oliveira e colaboradores (2002) que referem

taxas de 50 a 60% de positividade para os casos de linfomas pesquisados, mas que diferem do padrão epidemiológico apresentado por outros autores que detectaram o subtipo celularidade mista como predominante tanto na faixa etária pediátrica quanto na adulta (Zhou *et al.*, 2001; Lacroix *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos conduzidos por Ekstraand & Horning (2002) mostraram que o subtipo depleção linfocitária foi o que predominou na fase adulta.

O presente estudo possibilitou identificar que a ocorrência de linfomas predominou no sexo masculino em comparação ao feminino numa proporção máxima de 2:1 casos a favor do sexo masculino. Esses resultados são discordantes em relação ao observado em outro estudo (Thomas *et al.*, 2002).

Com base na detecção do genoma do EBV nas células de H-RS, vários estudos tem utilizado sondas complementares à seqüência do genoma viral, com o emprego da metodologia de HIS (Kapatai & Murray, 2007; Chang *et al.*, 2008) fortalecendo o consenso quanto à presença do EBV nas células tumorais.

O EBV possui dois transcritos virais (*EBER 1* e *EBER 2*) não poliadenilados, o que favorece sua permanência no núcleo da célula hospedeira, tornando-os excelentes alvos de detecção por HIS. Aliás, essa ferramenta permite identificar quais células abrigam o EBV no contexto histopatológico, em decorrência de sua alta sensibilidade (Preciado *et al.*, 1986).

Em nosso estudo, a taxa total de positividade para o gene *EBER 1* do EBV foi de 79% utilizando o método de HIS. Tais índices, sobretudo expressivos, além de consubstanciarem a relevância do EBV nos casos de

linfomas analisados reforçam os achados prévios de Trimèche e colaboradores (2007).

Em países desenvolvidos tem sido descrito taxas de aproximadamente 50% de positividade para o EBV nos casos de doença de Hodgkin registrados na América do Norte e Europa (Weiss & Chang, 1996; Trimèche *et al.*, 2007; Chang *et al.* 2008); enquanto que nos países em desenvolvimento essa associação incide na maioria dos casos investigados com freqüências variando de 70 a 100% para essas neoplasias linfóides (Chang *et al.*, 1993; Weinreb *et al.*, 1996, Vassalo *et al.*, 2001).

A correlação entre a presença do EBV e o sexo dos indivíduos com doença de Hodgkin em nossa análise, demonstrou um discreto predomínio no sexo masculino o que está de acordo com outros estudos (Elgui Oliveira *et al.*, 2002; Chang *et al.* 2008).

No tocante aos casos de DH neste estudo foi encontrada elevada frequência, do gene *EBER 1* nas amostras analisadas o que representou mais de 75% de positividade para o EBV. Takada (2000) sugere que a identificação do EBV nas células tumorais de casos de DH parece ser um indicador que favorece o desenvolvimento dessas neoplasias.

Em nossa investigação os linfonodos cervicais prevaleceram em 79% como sítio primário de infecção nos casos de DH. Diehl e colaboradores (2004) esclarecem que clinicamente, muitos pacientes apresentam linfadenopatia assintomática em região cervical ou supraclavicular, freqüentemente acompanhada de massas mediastinais detectadas por radiografia do tórax.

A correlação dos subtipos de DH associados aos casos EBV positivos parece variar de acordo com a faixa etária, o que tem sido enfatizado em estudos tanto na faixa infantil (De Matteo *et al.*, 2003) como na faixa adulta (Jarrett *et al.*, 2005). Observações pertinentes a faixa etária infantil mostraram taxas de 25% em estudo conduzido no Rio de Janeiro (Barros, 2007), corroborando aos achados de Araujo e colaboradores (2006) no qual é referido o predomínio do subtipo celularidade mista em 55% dos pesquisados.

Jarrett e colaboradores (2005) ao avaliarem 461 adultos jovens com DH não encontraram diferenças estatisticamente significativas quanto à sobrevida; enquanto que, em adultos com mais de 50 anos, EBV positivos os pacientes apresentaram pior evolução da DH com elevadas taxas de óbitos registrados ($p=0,003$).

Em nosso estudo, mais de 3/4 dos indivíduos com DH pertenciam ao subtipo esclerose nodular e foram EBV positivos por HIS, observando-se maior frequência na faixa etária de 16-30 anos. Em estudos conduzidos por Almars & Khalidi (2004) há referência de taxas inferiores (58%) para o subtipo celularidade mista quando comparado ao elevado percentual (82,3%) associados ao EBV registrado em nossa região.

Estudo anteriormente publicado relata o aumento da expressão de IL-10 em células H-RS em casos de DH EBV-positivos (Beck *et al.*, 2001). Fato também confirmado por Dukers e colaboradores (2000) que descreveram maior expressão de IL-10 em DH esclerose nodular EBV-positivos em relação a casos EBV-negativos (35,2% vs 18,1%). Por outro lado, Bohlen e colaboradores (2000) relataram que o pior prognóstico está associado aos altos

níveis de IL-10 em pacientes com DH. É possível que a secreção de IL-10 possa favorecer a sobrevivência de células infectadas pelo EBV, inibindo a resposta imunitária do hospedeiro e protegendo as células infectadas da lise induzida por linfócitos T citotóxicos (Mahot *et al.*, 2003).

Novas possibilidades de diagnóstico tem sido possível com os avanços recentes da biologia e genética molecular como recurso para o diagnóstico de doenças, detecção de patógenos, análise de mutações, teste genético, sequenciamento de DNA e análise das relações evolutivas.

Thorley-Lawson (2001) refere que o EBV possui distintos programas de expressão gênica, chamados “padrões de latência” específicos para as diferentes neoplasias; e que esses são relacionados com a origem celular e mecanismos etiopatogênicos do vírus. Geralmente os genes expressos pelo EBV em casos de DH são *EBER 1/2*, *LMP1/ 2* e *EBNA1*.

Estudos conduzidos por Young e Murray (2003) citam que transcritos do gene *EBER 1* são expressos em células latentemente infectadas num número elevado de cópias; atingindo a ordem de 10^6 transcritos por células. Por outro lado, Leight & Sugden (2000) relataram em seu estudo que a proteína *EBNA 1* media o início da síntese do DNA viral responsável pela segregação e manutenção do DNA viral.

Jebbink e colaboradores (2003) mostraram que a quantificação por PCR em tempo real para o EBV parece representar técnica eficaz para monitorar a terapia antiviral; pois pacientes com doença associadas ao EBV ou doentes em risco de desenvolver tais doenças tem demonstrado significativos títulos virais em comparação com indivíduos portadores de infecção latente.

Ryan e colaboradores (2004) analisaram a natureza quantitativa dos ensaios de PCR em tempo real para cinco segmentos do genoma (*BamH1W*, *EBNA 1*, *LMP 1*, *LMP 2* e *BZLF 1*) com o propósito de confirmar a presença do EBV, principalmente nos casos de doença auto-imune. Segundo esses autores, a detecção do gene *EBNA 1* parece mais adequada nas associações clínicas, visando à triagem de possíveis alterações genômicas virais.

Estudo realizado por Kimura e colaboradores (1999), caracterizou a importância da quantificação da carga viral do EBV por PCR em tempo real. De fato, ao obter uma carga viral de 315 cópias por mg de DNA de células mononucleares, os autores puderam estabelecer um critério para distinguir infecção latente de uma infecção aguda causada pelo EBV.

Outro aspecto metodológico a ser considerado neste estudo foi a utilização de DNA extraído a partir de tecidos biológicos fixados em formol e inclusos em parafina. Tal procedimento como descrito por Vilanova-Costa (2008) é de suma importância para o sucesso da amplificação que depende do grau de fragmentação do DNA obtido; principalmente quando se dispõe de amostras antigas. É interessante notar que segundo Nunan e colaboradores (2000) a interferência de inibidores da PCR tais como; o reagente aromático dimetilbenzeno (xilol) que tem ação decisiva em sua total degradação nas etapas iniciais do processo de extração, pode originar a formação de *cross-linkings* com proteínas, a qual aumenta com o maior tempo de fixação, mas também pelo dano direto que a formalina causa no DNA, assim também a proteinase K que pode degradar a DNA polimerase.

Por outro lado a utilização de outros espécimes clínicos tais como plasma (Chan *et al.*, 2005), sangue (Fafi-Kremer *et al.*, 2008) e linfócitos tem sido empregados mais frequentemente; dispensando a necessidade de biópsia em determinadas situações clínicas. Porém, convém assinalar que a aplicabilidade dos espécimes biológicos conservados em parafina tem sido de grande valia nos casos em que o tecido fresco não está disponível.

Gandhi e colaboradores (2006) mencionam que o emprego da PCR em tempo real, foi de grande valia para o monitoramento da resposta ao tratamento terapêutico dos casos EBV-DH positivos. Em nosso estudo, a frequência de positividade pela técnica de PCR em tempo real para a identificação da proteína *EBNA 1* foi de 53,1% e que quando comparada com 49,0% de positividade pela metodologia de HIS não mostram diferença estatisticamente significativa entre as duas metodologias quando submetidas as análises pelo qui-quadrado ($p = 0,887$). Esses resultados evidenciaram que seria mais acessível à análise inicial dos casos por HIS por ser uma metodologia menos onerosa, uma vez que o custo mais elevado do termociclador e dos reagentes usados na reação de PCR em tempo real tem limitado a aplicabilidade dessa metodologia na maioria dos laboratórios.

Convém assinalar que, outros autores têm confirmado que a metodologia da HIS é um importante recurso metodológico por permitir uma localização específica do material genético dentro da célula (Silva-Valenzuela *et al.*, 2006).

Apesar disso, a metodologia da PCR em tempo real tem mais vantagens por ser capaz de aumentar a especificidade e confiabilidade dos

resultados, por minimizar a possibilidade de contaminação pós-amplificação, além de diminuir o tempo na obtenção de resultados e, ainda, pelo fato que a interpretação dos resultados independe do observador. Finalmente, os métodos baseados em PCR são de grande valia para a tipificação viral, o que os tornam as técnicas preferenciais para o diagnóstico específico (Gulley, 2001).

Em conclusão, os achados deste estudo confirmam a hipótese de que o EBV seria um co-fator no processo de modificação de genes celulares envolvidos na tumorigênese de linfomas tais como: supressores tumorais, oncogenes e ou genes reguladores da apoptose.

5 CONCLUSÕES

1. Os linfomas ao longo dos dez anos de investigação (1996-2005) apresentaram maior prevalência para as faixas etárias: infantil (< 15 anos) e de adultos (> 45 anos) na região Norte do Brasil.
2. Os linfomas não Hodgkin por histopatologia corresponderam a 45% da casuística estudada.
3. A comparação das frequências dos subtipos de DH com relação ao sexo dos indivíduos pesquisados não mostrou diferença estatisticamente significativa.
4. A comparação entre os subtipos de DH associados ao EBV demonstrou maior prevalência do subtipo esclerose nodular.
5. As técnicas moleculares empregadas neste estudo (*HIS* e PCR em Tempo Real) são ferramentas que podem contribuir sobremaneira para estudos epidemiológicos retrospectivos sobre o EBV e outras neoplasias presentes no Norte do Brasil.
6. A presença desses agentes virais em expressiva parcela (76,9%) dos casos de DH reforça a hipótese que o EBV seria um co-fator no processo de transformação neoplásica, além da susceptibilidade genética do hospedeiro.
7. Foi detectado pela 1ª vez a presença dos genes *EBER 1* e *EBNA 1* do EBV em amostras de casos de DH da região Norte do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E.S., FERREIRA, F.V.A., ROCHA FILHO, F.D. Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análises morfológicas, imunoistoquímica e por hibridização *in situ*. **Jornal Brasileiro de Patologia**, **33**: 178-184, 1997.
- ALMASRI, N.M., KHALIDI, H.S. Epstein Barr virus expression in Hodgkin e disease in Jordan. **Saudi Medical Journal**, **25 (6)**: 770-775, 2004.
- AMBINDER, R.F., BROWNING, P.J., LORENZANA, I., LEVENTHAL, B.G., COSENZA, H., MANN, R.B., MACMAHON, E.M., MEDINA, R., CARDONA, V., GRUFFERMAN, S. Epstein-Barr virus and childhood Hodgkin's disease in Honduras and the United States. **Blood**, **81**: 462-467, 1993.
- ANDERSSON, J. Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma. **Herpes**, **13**: 12-16, 2006.
- ARAUJO, I., BITTENCOURT, A.L., BARBOSA, H.S., NETTO, E.M., MENDONÇA, N., FOSS, H.D., HUMMEL, M., STEIN, H. The high frequency of EBV infection in pediatric Hodgkin lymphoma is related to the classical type in Bahia, Brazil. **Virchows Archives**, **449**: 315-319, 2006.
- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D. L., SANTOS, A.S. **Bio Estat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5.ed. Belém: Mamirauá, 2007.

- BACCHI, C.E., BAZAN, R., PADOVANI, E.G., RABENHORST, S.H., BACCHI, M.M. Linfoma do sistema nervoso central: associação com o vírus de Epstein-Barr. **Jornal Brasileiro de Patologia**, **32**: 103-109, 1996.
- BAER, R., BANKIER, A.T., BIGGIN, M.D., DEININGER, P.L., FARRELL, P.J., GIBSON, T.J., HATFULL, G., HUDSON, G.S., SATCHWELL, S.C., SÉGUIN, C., TUFFNELL, P.S., BARRELL, B.G. DNA sequence and expression of the B-95 Epstein Barr virus genoma. **Nature**, **310**: 207-211, 1984.
- BARROS, M. Marcus Barros talks about the environment and tropical diseases in the Amazon. Interview by Stella Oswaldo Cruz Penido. Introduction by Ruth B. Martins. **History Ciencia Saude Manguinhos**. 291-302, 2007.
- BECK, A., PÄZOLT, D., GRABENBAUER, G.G., NICHOLLS, J.M., HERBST, H., YOUNG, L.S., NIEDOBITEK, G. Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. **The journal of Pathology**, **194**: 145-151, 2001.
- BLACK, F.L., HIERHOLZER, W.J., PINHEIRO, F.P., EVANS, A.S., WOODALL, J.P., OPTON, E.M., EMMONS, J.E., WEST, B.S., EDSALL, G., DOWNS, W.G., WALLACE, G.D. Evidence for persistence of infectious agents in isolated human populations. **American Journal of Epidemiology**, **100**: 220-250, 1974.

- BLACK, F.L., WOODALL, J.P., EVANS, A.S., LIEBHABER, H., HENLE, G.
Prevalence of antibody against viruses in the Tiriyo, an isolated Amazon tribe.
American Journal of Epidemiology, **91**: 430-438, 1970.
- BLEYER, A., VINY, A., BARR, R. Cancer in 15- to 29-year-olds by primary site.
The Oncologist, **11**: 590-601, 2006.
- BOHLEN, H., KESSLER, M., SEXTRO, M., DIEHL, V., TESCH, H. Poor clinical
outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10
serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for
Hodgkin's disease. **Annals of Hematology**, **79**: 110-113, 2000.
- BOYLE, M.J., VASAK, E., TSCHUCHNIG, G.M., TURNER, J.J., SCULLEY, T.,
PENNY, R., COOPER, D.A., TINDALL, B., SEWELL, W.A. Epstein Barr virus
(EBV) in Hodgkin's disease: association between B types and
immunocompromise. **Blood**, **81**: 468-474, 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS
(DATASUS). **Informações de saúde**. 2007. Disponível em:
<<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>>. Acesso em:
11 mar. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde.
Instituto Nacional de Câncer. **Câncer no Brasil**: dados dos registros de
câncer de base populacional. Rio de Janeiro, INCA, 2005. v. 2.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer no Brasil: dados dos registros de câncer de base populacional.** Rio de Janeiro, INCA, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro INCA, 2009.
- BUISSON, M., MORAND, P., GENOULAZ, O., BOURGEAT, M.J., MICOUD, M., SEIGNEURIN, J.M. Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. **The Journal of General Virology**, **75**: 431-437, 1994.
- BURKITT, D. A sarcoma involving the jaws in African children. **The British Journal Surgery**, **46**: 218-223, 1958.
- BUSSON, P., KERYER, C., OOKA, T., CORBEX, M. EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies: **Trends in Microbiology**, **12**: 356-360, 2004.
- CANDEIAS, J.A.N., PEREIRA, M.S. Pesquisa de anticorpos para o vírus EB em adultos e crianças. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **12**: 333-338, 1970.
- CEN, H., BREINIG, M.C., ATCHISON, R.W., HO, M., MCKNIGHT, J.L.C. Epstein-Barr virus transmission via the donor organs in solid organ transplantation: polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of IR2, IR3 and IR4. **Journal of Virology**, **65**: 976-980, 1991.

CHANG, K.C., CHEN, P.C., JONES, D., SU, I.J. Changing patterns in the frequency of Hodgkin lymphoma subtypes and Epstein-Barr virus association in Taiwan. **Cancer Science**, **99**: 345-349, 2008.

CHANG, K.C., KHEN, N.T., JONES, D., SU, I.J. Epstein-Barr virus is associated with all histological subtypes of Hodgkin lymphoma in Vietnamese children with special emphasis on the entity of lymphocyte predominance subtype. **Human Pathology**, **36**: 747-755, 2005.

CHANG, K.L., ALBUJAR, P.F., CHEN, Y.Y., JOHNNSON, R.M., WEISS, L.M. High prevalence of Epstein Barr virus in the *Reed-Sternberg* cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. **Blood**, **81**: 496-501, 1993.

CHU, P.G., CHEN, Y.Y., CHEN, W., WEISS, L.M. No direct role for Epstein-Barr virus in American hepatocellular carcinoma. **The American Journal of Pathology**, **159**: 1287-1292. 2001.

COHEN, J.L. Epstein Barr virus infection. **The New England Journal of Medicine**, **343**: 481-491, 2000.

CRAWFORD, D.H. Biology and disease associations of an Epstein Barr virus. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, **356**: 461-473, 2001.

CRAWFORD, D.H., SWERDLOW, A.J., HIGGINS, C., MCAULAY, K., HARRISON, N., WILLIAMS, H., BRITTON, K., MACSWEEN, K.F. Sexual history and Epstein-Barr virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, **186**: 731-736, 2002.

- CRUCHLEY, A.T., MURRAY, P.G., NIEDOBITEK, G., REYNOLDS, G.M., YOUNG, L.S. The expression of the Epstein Barr virus nuclear antigen (*EBNA-1*) in oral hair leukoplakia. **Oral Disease, (Suppl 1):** 177-179, 1997.
- DE MATTEO, E., BARON, A.V., CHABAY, P., PORTA, J., DRAGOSKY, M., PRECIADO, M.V. Comparison of Epstein-Barr virus presence in Hodgkin lymphoma in pediatric versus adult Argentine patients. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 127:** 1325-1329, 2003.
- DELECLUSE, H.J., HAMMERSCHMIDT, W. The genetic approach to the Epstein Barr virus: from basic virology to gene therapy. **Journal of Clinical Pathology, 53:** 270-279, 2000.
- DIEHL, V. Chemotherapy or Combined Modality Treatment: The Optimal Treatment for Hodgkin's Disease. **Journal of Clinical Oncology, 22:** 15-18, 2004.
- DUKERS, D.F., JASPARS, L.H., VOS, W. Quantitative immunohistochemical analysis of cytokine profiles in Epstein-Barr virus-positive and -negative cases of Hodgkin's disease. **Journal of Pathology, 190:** 143-149, 2000.
- ELGUI DE OLIVEIRA, D. Detection and expression of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in tissues from penile tumors in Brazil. **Cancer, 215:** 79-82, 2004.
- ELGUI DE OLIVEIRA, D., BACCHI, M.M., ABREU, E.S., NIERO-MELO, L., BACCHI, C.E. Hodgkin disease in adult and juvenile groups from two different geographic regions in Brazil. **American Journal of Clinical Pathology, 118:** 25-30, 2002.

EKSTRAND, B.C., HORNING, S. J. Lymphocyte predominant Hodgkin's disease: more patience than patients. **Cancer Journal**, **8**: 377-383, 2002.

EPSTEIN, M.A., ACHONG, B.G., BARR, Y.M. Virus particles in cultured lymphoblast's from Burkitt's lymphoma. **Lancet**, **1**: 702-703, 1964.

EVANS A. S. Clinical syndromes associated with EB virus infections. **Annals of Internal Medicine**, **18**: 77-93, 1972.

FACHIROTH, J., SCHOUTEN, T., HARIWIYANTO, B., PARAMITA, D.K., HARIJADI, A., HARYANA, S.M., MIDDELDORP, J.M. Molecular diversity of Epstein Barr virus IgG and IgA antibody responses in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of Indonesian, Chinese and European subjects. **The Journal of Infectious Diseases**, **190**: 53-62, 2004.

FAFI-KREMER, S., MORAND, P., BARRANGER, C., BARGUÈS, G., MAGRO, S., BÈS, J., BOURGEOIS, P., JOANNES, M., SEIGNEURIN, J.M. Evaluation of the Epstein-Barr virus R-gene quantification kit in whole blood with different extraction methods and PCR platforms. **Journal Molecular Diagnostics**, **10**: 78-84, 2008.

GANDHI, M.K., LAMBLEY, E., BURROWS, J., DUA, U., ELLIOTT, S., SHAW, P.J., PRINCE, H.M., WOLF, M., CLARKE, K., UNDERHILL, C., MILLS, T., MOLLEE, P., GILL, D., MARLTON, P., JOHN F., SEYMOUR, J.F., RAJIV KHANNA, R. Plasma Epstein-Barr Virus (EBV) DNA is a Biomarker for EBV-Positive Hodgkin's Lymphoma. **Clinical Cancer Review** **12**: 469-464, 2006.

- GANDHI, M.K., TELLAM, J.T., KHANNA, R. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. **British Journal Haematology**, **125**: 267-281, 2004.
- GRATAMA, J. W., ERNBERG, I. Molecular epidemiology of Epstein Barr virus infection. **Advances in Cancer Research**, **67**: 197-253, 1995.
- GREENN, M., REYES, J., JABBOUR, N., YUNIS, E., PUTNAM, P., TODO, S., ROWE, D. Use of quantitative PCR to predict onset of Epstein Barr viral infection and post-transplant lymphoproliferative disease after intestinal transplantation in children. **Transplantation Proceedings**, **28**: 2759-2760, 1996.
- GRUFFERMAN, S., DELZELL, E. Epidemiology of Hodgkin's disease. **Epidemiologic reviews**, **6**: 76-106.1984.
- GULLEY, M. Molecular diagnosis of Epstein Barr virus-related diseases. **Journal of Molecular Diagnostic**, **3**: 1-10, 2001.
- GULLEY, M.L., EAGAN, P.A., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., PICADO, A.L., SMIR, B.N., CHILDS, C., DUNN, C.D., CRAIG, F.E., WILLIAMS, J.W., BANKS, P.M. Epstein Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the *Reed-Sternberg* cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and Hispanic American ethnicity. **Blood**, **83**: 1595-1602, 1994.
- GULLEY, M.L., TANG, W. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. **Journal Molecular Diagnostics**, **10**: 279-292, 2008.

HENLE, G., HENLE, W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. **Journal of Bacteriology**, **91**: 1248-1256, 1966.

HENLE, G., HENLE, W. Immunofluorescence, interference and complement fixation technique in the detection of the herpes types virus in *Burkitt's* tumor cell lines. **Cancer Research**, **27**: 2442-2446, 1967.

HENLE, G., HENLE, W., CLIFFORD, P., DIEHL, V., KAFUKO, G.W., KIRYA, B.G., KLEIN, G., MORROW, R.H., MUNUBE, G.M., PIKE, P.M., TUKEI, P.M., ZIEGLER, J.L. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. **Journal National Cancer Institute**, **43**: 1147-1157, 1969.

DIEHL, V. Chemotherapy or Combined Modality Treatment: The Optimal Treatment for Hodgkin's Disease. **Journal of Clinical Oncology**, **22**: 15-18, 2004.

JARRETT, R.F., STARK, G.L., WHITE, J., ANGUS, B., ALEXANDER, F.E., KRAJEWSKI, A.S., JUNE FREELAND, J., TAYLOR, G.M., TAYLOR, P.R.A. Impact of tumor Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. **Blood**, **106(7)**: 2444-2451, 2005.

JEBBINK, J., BAI, X., ROGERS, B.B., DAWSON, D.B., SCHEUERMANN, R.H., DOMIATI-SAAD, R. Development of real-time PCR assays for the quantitative detection of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus, comparison of TaqMan probes, and molecular beacons. **Journal of Molecular Diagnostics**, **5**:15-20, 2003.

- KAFUKO, G.W., HENDERSON, B.E., KIRYA, B.G., MUNUBE, G.M. Epstein-Barr virus antibody levels in children from the West Nile district of Uganda. **Lancet**, **1**: 706-709, 1972.
- KAPATAI, G., MURRAY, P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. **Journal Clinical Pathology**, **60**: 1342-1349, 2007.
- KENAGY, D.N., SCHLESINGER, Y., WECK, K., RITTER, J.N., GAUDREAULT-KEENER., STORCH, G.A. Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood leukocytes of patients with postransplant lymphoproliferative disease. **Transplantation**, **60**: 547-554, 1995.
- KENECHT, H., BERGER, C., ROTHENBERGER S., ODERMATT, B.F., BROUSSET, P. The role of Epstein Baar virus in neoplastic transformation. **Oncology**, **60**: 289-302, 2001.
- KHANNA, R., BURROWS, S.R., MOSS, D.J. Immune regulation in Epstein-Barr virus associated diseases. **Microbiology Reviews**, **59**: 387-405, 1995.
- KIEFF, E.D., RICKINSON, A.B. Epstein Barr virus and Its replication In: **Fields Virology**. 5th. knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strus, S.S. (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 2601-2610.

KIM, H.K., SILVER, B., LI, S., NEUBERG, D., MAUCH, P. Hodgkin's disease in elderly patients (> or =60): clinical outcome and treatment strategies. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, **56**: 556-560, 2003.

KIMURA, H., MORITA, M., YABUTA, Y., KUZUSHIMA, K., KATO, K., KOJIMA, S., MATSUYAMA, T., MORISHIMA, T. Quantitative analysis of Epstein Barr virus load by using a real time PCR assay. **Journal Clinical Microbiology**, **37**: 132-136, 1999.

KLUMB, C.E., HASSAN, R., DE OLIVEIRA, D.E., DE RESENDE, L.M., CARRICO, M.K., DOBBIN, J., POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S., BACCHI, C.E., MAIA, R.C. Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. **Journal of Cancer**, **108**: 66-70, 2004.

KULWICHIT, W., EDWARDS, R.H., DAVENPORT, E.M., BASKAR, J.F., GODFREY, V., RAAB-TRAUB, N. Expression of the Epstein Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **95**: 11963-11968, 1998.

LACROIX, A., JACCARD, A., ROUZIUX, C., PIGUET, C., PETIT, B., BORDESSOULE, D., RANGER-ROGEZ, S. HHV-6 and EBV DNA quantitation in lymph nodes of 86 patients with Hodgkin's lymphoma. **Journal of Medical Virology**, **79**: 1349-1356, 2007.

- LANG, D.J., GARRUTO, R.M., GAJDUSEK, D.C. Early acquisition of CMV and EBV antibodies in several isolated Melanesian population. **American Journal Epidemiology**, **105**: 480-487, 1977.
- LEICHT & SUGDEN. EBNA 1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. **Reviews Medical Virology** **19**: 83-100, 2000
- LEONCINI, L., SPINA, D., NYONG'O, A., ABINYA, O., MINACCI, C., DISANTO, A., DE LUCA, F., DE VIVO, A., SABATTINI, E., POGG, S., PILER, S., TOSI, P. Neoplastic cells of Hodgkin's disease show differences in EBV expression between Kenya and Italy. **International Journal of Câncer**, **65**: 781-784. 1996.
- LIEBOWITZ, D. Epstein Barr virus and a cellular signaling pathway in lymphomas from immunosuppressed patients. **The New England Journal of Medicine**, **338**: 1413-1421, 1998.
- LI, F., LINAN, M.J., STEIN. M.C. Reduced expression of peptide-loaded HLA class I molecules on multiple sclerosis lymphocytes. **Anual Neurology**, **38**: 147-154, 1995.
- LOPES L.F., BACCHI, M.M., DE-OLIVEIRA, D.E., ZANATI S.G., ALVARENGA, M., BACCHI, C.E. Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **32**: 1707-1712, 2004.

LOUREIRO, M.M., MORAIS, J.C., MILITO, C.B., PORTUGAL, R.D., PULCHERI, W., SPECTOR, N. Expression of Epstein Barr virus in patients with Hodgkin`s disease: report of 64 cases from Rio de Janeiro, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, **40**: 1-8, 2004.

MAHOT, S., SERGEANT, A., DROUET, E., GRUFFAT, H. A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. **Journal Genetic Virology**, **84**: 965-974, 2003.

MANIATS, T., FRITACH, E., SAMBROCK, J. **Molecular cloning**: A laboratory manual. Nova York, Cold Spring Harbor, 1989.

MONTEIRO, T.A.F., GOMES, M.L.C., FREITAS, R.B., GUSMÃO, R.H.P., OLIVEIRA, C.S., CAVALCANTE, V.L.N., SOUSA, M.R.S., PRIMO, E.G., LINHARES, A.C. Prevalência de anticorpos para o vírus de Epstein Barr em Belém, Pará, Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, **12**: 8-12, 1998.

MONTEIRO, T.A.F., WANZELER, A.L.M., LINHARES A.C. Antibodies to Epstein-Barr virus among Xikrin Indians. In: ENCONTRO DE VIROLOGIA, 5., 1995, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Virologia, 1995. A-72.

MURRAY, P.G., YOUNG, L.S. Themed issue: the biology and pathology and of the Epstein Barr virus. **Molecular Pathology**, **53**: 219-221, 2000.

- MUSACCHIO, J.G., CARVALHO, G., MORAIS, J.C., SILVA, N.H., SCHELIGA, A., ROMANO, S., SPECTOR, N. Detection of free circulating Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with Hodgkin's disease. *São Paulo Medical Journal*, 124: 154-157, 2006.
- NIEDOBITEK, G., AGATHANGGELOU, A., HERBST, H., WHITEHEAD, L., WRIGHT, D.H., YOUNG, L.S. Epstein Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. ***Journal of Pathology***, 182: 151-159, 1997.
- NUNAN, L.M., POULOS, B.T., LIGHTNER, D.V. Use of Polymerase Chain Reaction for the Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Penaeid Shrimp. ***Mar Biotechnology***, 2: 319-328, 2000.
- OMETTO, L., MENIN, C., MASIERO, S., BONALDI, L., DEL MISTRO, A., CATTELAN, A.M., D'ANDREA, E., DE ROSSI, A., CHIECO-BIANCHI, L. Molecular profile of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus type 1 related lymphadenopathies and lymphomas. ***Blood***, 90: 313-322, 1997.
- PAES, R.A.P., PLAZA, R.A., BARREZUELA, L.F.M., BRUNIERA, P. Três casos de carcinoma de nasofaringe associados ao vírus de Epstein-Barr (EBV) em crianças: Aspectos clínicos, patológicos e imunohistoquímicos. ***Jornal Brasileiro de Patologia***, 32: 76-82, 1996.
- PEREIRA, M.S., BERKE, J.M., MACRAE, A.D. Epstein-Barr virus antibody at different ages. ***British Medical Journal***, 4: 526 -527, 1969.

PERKINS, R.S., SAHM, K., MARANDO, C., DICKSON-WITMER, D., PAHNKE, G.R., MITCHELL, M., PETRELLI, N.J., BERKOWITZ, I.M., SOTEROPOULOS, P., ARIS, V.M., DUNN, S.P., KRUEGER, L.J. Analysis of Epstein-Barr virus reservoirs in paired blood and breast cancer primary biopsy specimens by real time PCR. **Breast Cancer Research**, **8**: R70, 2006.

PRECIADO, M.V., CRISTOBAL, E., MENARGUEZ, J., MARTINEZ MONTERO, J.C., DIEZ, B., DE MATTEO, E., GRINSTEIN, S. Oncogene expression in tumour cells of pediatric Hodgkin's disease in Argentina--correlation with Epstein Barr virus presence. **Pathology Research and Practice**, **94**: 25-31, 1998.

RAAB-TRAUB, N. Epstein Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. **Seminars in Cancer Biology**, **3**: 297, 1992.

RICKINSON, A.B., KIEFF, E.D. Epstein Barr virus In: **Fields Virology**. 5th. Knipe, D, M., Howley .P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strus, S.S. (eds). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 2656-2660.

REZK, S.A., WEISS, L.M. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. **Human Pathology**, **38**: 1293-1304, 2007.

RYAN, J.L., FAN, H., GLASER, S.L., SCHICHMAN S.A., RAAB-TRAUB N., GULLEY, M.L. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. **Journal of Molecular Diagnostic**, **6**: 378-385, 2004.

SANTIAGO, T.C.B. **Índice de proliferação celular Ki 67 nos diferentes subtipos do linfoma de Hodgkin**: estudo descritivo. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica) – Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2002. 60 p.

SCULLEY, T.B., APOLLONI, A., HURREN, L., MOSS, D.J., COOPER, D.A. Coinfection with A and B type Epstein-Barr virus Clinic human immunodeficiency virus-positive subjects. **The Journal of Infection Diseases**, **162**: 643-648, 1990.

SILVA, G.N., BACCHI, M.M., RAINHO, C.A., DE OLIVEIRA, D.E. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. **Archives Pathology Laboratory Medical**, **131**: 1691-1696, 2007.

SILVA-VALENZUELA, M.G.; ALMEIDA, F.C.S., MATIZONKAS-ANTONIO, L. F., LIBÓRIO, T.N., ACQUAFREDA, T., CAZAL, C., FERRAZI, A., NUNES, F. D. Hibridização *in situ* com sonda não radioativa para mRNA: Princípios e aplicações em patologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, **42**: 207-213, 2006.

SIXBEY, J.W., LEMON, S.M., PAGANO, J.S. A second site for Epstein Barr virus shedding: the uterine cervix. **Lancet**, **15**: 1122-1124, 1986.

SIXBEY, J.W., VESTERINEN, E.H., NEDRUD, J.G., RAAB-TRAUB, N., WALTON, L.A., PAGANO, J.S. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected *in vitro*. **Nature**, **306**: 480-483, 1983.

STEIN, H., DELSON, G., PITER, S. Clinical Hodgkin lymphoma. In: **Pathology and genetics of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues**. Jaffe, E.F., Harris, M.L., Stein, H. (eds). Lyon, World Health Organization Classification of Tumours, 2001. p 244-253.

STRAUS, S.E., COHEN, J.I., TOSATO, G., MEIER, J. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis and management. **Annual International Medical**, **118**: 45-58, 1992.

SUBRAMANIAN C., COTTER, M.A., ROBERTSON, E.S. Epstein Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. **Nature Medicine**, **7**: 350-355, 2001.

SUBRAMANIAN, C., KNIGHT, J.S., ROBERTSON, E.S. The Epstein Barr nuclear antigen EBNA3c regulates transcription, cell transformation and cell migration. **Frontiers in Bioscience**, **7**: 704-716, 2002.

SVEDMYR, A., DEMISSIE, A. Age distribution of antibodies to Burkitt's cells. **Acta Pathology Microbiology Scand**, **73**: 653-654, 1968.

- TAKADA K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **Molecular Pathology**, **53**: 255-261, 2000.
- THOMAS, J.A., ALLDAY, M., CRAWFORD, D.H. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in immunocompromised individuals. **Advances in Cancer Research**, **57**: 329, 1991.
- THOMAS, R.K., RE, D., ZANDER, T., WOLF, J., DIEHL, V. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. **Annals of Oncology**, **13(Suppl 4)**:147-152, 2002.
- THORLEY-LAWSON, D.A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. **Natural Revist Immunology**,**1**: 75-82, 2001.
- THORLEY-LAWSON, D.A., GROSS, A. Persistence of the Epstein barr virus and the origins of associated lymphomas. **The New England Journal of Medicine**, **350**: 1328-1337, 2004
- TISCHENDORF, P., SHRAMEK, G.J., BALAGTAS, R.C., DEINHARDT, F., KNOSPE, W.H., NOBLE, G.R., MAYNARD, J.E. Development and persistence of immunity to Epstein-Barr virus in man. **The Journal of Infection Disease**, **122**: 401-409, 1970.
- TRIMÈCHE, M., BONNET, C., KORBI, S., BONIVER, J., DE LEVAL, L. Association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's lymphoma in Belgium: a pathological and virological study. **Leukemia and Lymphoma**, **48(7)**: 1323-1331, 2007.

VAN PARIJS L., ABBAS A.K. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. **Current Opinion in Immunology**, **8**: 355-361, 1996.

VASSALLO, J., METZE, K., TRAINA, F., DE SOUZA, C.A., LORAND-METZE, I. Expression of Epstein-Barr virus in classical Hodgkin's lymphomas in Brazilian adult patients. **Haematologica**, **86**: 1227-1228, 2001.

VILANOVA-COSTA, C.A., NÓBREGA, J.B. Extração e purificação de DNA em material biológico parafinizado. **Estudos**, **35 (1/2)**: 143-152, 2008.

WEINREB, M., DAY, P.J., NIGGLI, F., GREEN, E.K., NYONG'O, A.O., OTHIENO-ABINYA, N.A., RIYAT, M.S., RAAFAT, F., MANN, J.R. The consistent association between Epstein Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. **Blood**, **87**: 3828, 1996.

WEISS, L.M., CHANG, K.L. Association of the Epstein-Barr virus with hematomphoid neoplastic. **Advances in Anatomic Pathology**, **3**:1-15, 1996.

WEISS, L.M., CHEN, Y.Y., LIU, X., SHIBATA, D. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerize chain reaction study. **American Journal Pathology**, **139**: 1259-1265, 1991.

WEISS, L.M., MOVAHHED, L.A., WARNNKE, R.A., SKLAR, J. Detection of Epstein Barr virus genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. **National English Journal Medical**, **320**: 502, 1989.

- WILSON, J.B., BELL, J.L., LEVINE, A.J. Expression of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. **The EMBO Journal**, **15**: 3117-3126, 1996.
- WOLF, H., MARGRET, H., EBERHERD, W. Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland. **Pediatric Infectious Diseases**, **51**: 795-798. 1984.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2009.
- YAO, Q.Y., CROOM-CARTER, D., TIEERNEY, R.J., HABESHAW, G., WILDE, J.T., HILL, F.G., CONION, C., RINCKINSON, A.B. Epidemiology of infection with Epstein Barr virus types 1 and 2: Lessons from the study of a T-cell-immunocompromised hemophilic cohort. **Journal of Virology**, **72**: 4352-4363, 1998.
- YAO, Q.Y., ROWE, M., MARTIN, B., YOUNG, L.S., RICKINSON, A.B. The Epstein Barr virus carrier state. Dominance of a single growth-transforming isolate in the blood and in the oropharynx of healthy virus carriers. **The Journal of General Virology**, **72**: 1579-1590, 1991.
- YAO, Q.Y., TIERNEY, R.J., CROOM-CARTER, D., COOPER, G.M., ELLIS, C.J., ROWE, M., RICKINSON, A.B. Isolation of intertypic recombinants of Epstein-Barr virus from T-cell immunocompromised individuals. **Journal of Virology**, **70**: 4895-4903, 1996a .

YAO, Q.Y., TIERNEY, R.J., CROOM-CARTER, D., DUKERS, D., COOPER, G.M., ELLIS, C.J.; ROWE, M.; RICKINSON, A.B. Frequency of multiple Epstein Barr virus infections in T-cell immunocompromised individuals. **Journal of Virology**, **70**: 4884-4894, 1996b.

YOUNG, L.S., MURRAY, P.G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. **Oncogenesis**, **22**: 5108-5121, 2003.

YOUNG, L.S; RICKINSON, A. Epstein Barr virus: 40 years on. **Nature Reviews Cancer** **4**, 757-768, 2004.

ZHOU, X.G., SANDVEJ, K., LI, P.J., JI, X.L., YAN, Q.H., ZHANG, X.P., DA, J.P., HAMILTON-DUTOIT, S.J. Epstein-Barr virus (EBV) in Chinese pediatric Hodgkin disease: Hodgkin disease in young children is an EBV-related lymphoma. **Cancer** **15: 92**:1621-1631, 2001.

ANEXOS

Anexo A – Documento referente à aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas.



Carta de nº 0024/2007
Protocolo CEP/IEC - Nº 0025/07
CAAE: 0028.0.072.000-07

Ananindeua/PA, 1 de outubro de 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: “Caracterização molecular do vírus de Epstein Barr em tecidos de pacientes suspeitos de doenças Hodgkin da região amazônica brasileira”.


Pesquisador Responsável TALITA ANTONIA FURTADO MONTEIRO

Conforme tramitação junto ao CEP/IEC, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

Anexo B – Ficha epidemiológica para coleta de informações dos pacientes pesquisados.

Projeto: Caracterização molecular do vírus de Epstein Barr (EBV) em tecidos de pacientes suspeitos de doença de Hodgkin da região Amazônica brasileira

FICHA EPIDEMIOLÓGICA

COD:DH _____ Registro: _____

Razão () Pesquisa () Rotina

PROCEDÊNCIA: () Hospital Ofir Loiola () Instituto Evandro Chagas

Outros _____

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Sexo: () Fem. () Masc. Idade : _____ Estado Civil : () Solt. () Cas.

Endereço: _____

Procedência _____

Profissão: _____ Ocupação: _____

Vícios: () fumar () beber Soluções químicas: () sim () não

Soluções Químicas: _____

Anos de exposição: _____

História de câncer na família: () sim () não Quantos _____

Tipos de Câncer familiar : _____

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

Diagnóstico Anatomopatológico: _____

Subtipo Histológico _____

Localização do tumor Primário: _____

PROCEDIMENTO LABORATORIAL:

Data de preparo da lâmina: ____/____/____

Data da hibridização *in situ*: ____/____/____**RESULTADO: EBV sonda (EBER)** Positivo Negativo Duvidoso

Kit: _____ Lote: _____

ERROS: _____

PCR EM TEMPO REAL

Data: ____/____/____

PRIMERS: _____

Extração: _____

Resultados: _____

EBNA 1 _____

Outras Considerações:

ANEXO C – Composição das soluções preparadas para complementação do *kit* de hibridização *in situ*, segundo recomendações da “Clark LaboratoriesTM”.

1 PROTEINASE K BUFFER pH 7.6

Tris/HCl 50 mM (GIBICO-BRL ref. 15506-017)	7,8 g
Água <i>milli-Q</i> q.s.p.	1000 mL

2 TRIS-BUFFERED SALINO (TBS), pH 7.6

Tris/HCL 50 mM (GIBICO-BRL, ref. 15506-017)	7,8 g
NaCl 150 mM (MERK Ant. 6404)	8,7 g
Água <i>milli-Q</i> q.s.p.	1000 mL

3 SOLUÇÃO DE BLOQUEIO

SORO ALBUMINA BOVINA (TBS) 3%	3 g
TRITON X-100 1% (Pharmacia Biotech, ref 17-1315-01)	0,1 mL
PBS	100 mL

4 SOLUÇÃO TAMPÃO DE SUBSTRATO FOSFATASE ALCALINA, pH 9,0.

Tris HCL 100 mM (GIBICO-BRL, ref. 15506-017)	15,76 g
NaCl 100 mM (MERK, Ant. 6404)	5,84 g
Água <i>milli-Q</i> q.s.p.	1000 mL

5 TRITON X-100 0,1%

TRITON X-100 (Pharmacia Biotech, ref 17-1315-01)	0,1 mL
TBS	100 mL

6 DILUENTE DO ANTICORPO CONJUGADO

SORO ALBUMINA BOVINA (BSA) 3%	3g
TRITON X-100 (Pharmacia Biotech, ref 17-1315-01)	0,1 mL
TBS	100 mL

7 SORO DE COELHO 1:5 (SOLUÇÃO DE BLOQUEIO)

SORO DE COELHO	300 uL
TBS a 3%, TRITON X-100 0,1%	1200 uL

8 SOLUÇÃO TAMPÃO DE SUBSTRATO FOSFATASE ALCALINA, pH 9,0

Tris HCL 100 mM (GIBICO-BRL, ref. 15506-017)	15,76 g
MgCl ₂ 50 mM	10,16 g
NaCl 100 mM (MERK Ant. 6404)	5,84 g
Água <i>milli</i> Q q.s.p.	1000 mL

9 ETANOL 95%

ETANOL	95 mL
Água <i>milli</i> -Q q.s.q	5 mL

10 ETANOL 99%

ETANOL	99 mL
Água <i>milli-Q</i> q.s.p.	1 mL

11 DILUIÇÃO DO ANTI-FITC/AP (1:100)

Solução de RABBIT F (ab`) <i>anti-FITC/AP</i>	0,25 mL
TBS,3%, BSA, 0,1%, TRITON X-100	24,75 mL

12 DILUIÇÃO da ENZIMA SUBSTRATO (1:50)

SUBSTRATO ENZIMA	0,4 mL
Tris/Hcl 100 mM, MgCL ₂ 50 mM, NaCl100mM <i>pH</i> 9,0	19,6 mL