

# **A transversalidade do vírus Epstein-Barr e suas consequências benignas e malignas mais frequentes**

Carolina Martins Batista

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(mestrado integrado)

Orientador: Dra. Leopoldina Luís António Vicente

maio de 2020



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha avó, ela que estará sempre presente na minha vida, e a quem gostaria de presentear com o culminar deste troço, extenso, trabalhoso, porém bastante gratificante do meu percurso.

Anos repletos de vastos acontecimentos, muitos deles sem aparente justificação ou atribuição do autêntico valor no passado. Hoje, é-me possível entender as suas razões de ser e o quanto sou pelo que existiu, o quanto se alinha o que já desalinhado esteve.



## **Agradecimentos**

Aos meus pais e irmão que sempre me apoiaram nesta jornada. Devo-lhes mais do que posso explicar.

À Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, pela oportunidade de formação.

À Dra. Leopoldina Vicente, pelo apoio e confiança que me consignou desde início.

A todos os meus amigos, que partilharam comigo momentos difíceis, mas também os mais risonhos ao longo deste percurso.

Uma casa não se constrói na ausência dos pilares fulcrais. O equilíbrio estrutural deve-se à combinação de todos eles de forma harmoniosa.

Aos meus verdadeiros pilares devo tudo, o meu mais sincero obrigada.



## Resumo

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um vírus de DNA, pertencente à família *gamma-herpesvirus*, causador de 2% dos tumores a nível mundial. Trata-se de um vírus com tropismo para células B e células epiteliais, associando-se a patologias benignas, mais frequentemente a mononucleose infecciosa (MI), a patologias malignas, como o linfoma de Burkitt (LB), o linfoma de Hodgkin (LH), o linfoma extranodal de células NK-T (LENKT)-tipo nasal, o linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), o carcinoma nasofaríngeo (CN) e a doenças autoimunes como a esclerose múltipla (EM).

A sua descoberta deu-se em 1964, num linfoma de Burkitt de uma criança originária da África Subsariana e sabe-se que atualmente aproximadamente 90% dos adultos saudáveis são portadores deste mesmo vírus. Os programas encontrados nestes indivíduos são os mesmos que os encontrados nos indivíduos que desenvolveram tumores associados. A transmissão do vírus é mais frequentemente realizada através da saliva embora possa ocorrer através de outras vias, como transplantes e transfusões sanguíneas. A infeção primária por EBV possui dois picos de incidência, um durante a infância e outro durante a adolescência/início da idade adulta, sendo que no primeiro é habitualmente assintomática e no segundo, manifesta-se maioritariamente pelo quadro de MI. A MI é uma doença benigna que habitualmente necessita apenas de tratamento sintomático, baseado no alívio da febre e dor, da hidratação e repouso. O diagnóstico da infeção primária por EBV efetua-se habitualmente pelo “teste *monospot*”. No entanto, em alguns casos é necessário recorrer ao teste dos anticorpos específicos contra o EBV devido a forte suspeita de infeção por EBV, apesar de um *monospot* ser negativo. A patologia autoimune mais associada ao EBV é a EM, e sabe-se que os indivíduos que no curso da infeção primária desenvolvem MI têm um risco 2-3 vezes superior de desenvolver EM.

A presente dissertação pretende efetuar uma revisão da literatura existente, no âmbito de melhor caracterizar a epidemiologia, sintomatologia, fisiopatologia e mecanismos de ação do vírus EBV nas doenças benignas e malignas a ele mais frequentemente associadas, assim como as estratégias terapêuticas e/ou preventivas baseadas no mecanismo pelo qual o vírus se associa a cada patologia.

## Palavras-chave

Vírus Epstein-Barr; Fisiopatologia; Epidemiologia; Mononucleose Infecciosa; Neoplasias.



## **Abstract**

The Epstein-Barr virus (EBV) is a DNA virus belonging to the gamma-herpes family, which causes 2% of tumors worldwide. It is a virus with tropism for B cells and epithelial cells, associated with benign pathologies, more often infectious mononucleosis (IM), malignant pathologies, such as Burkitt's lymphoma (BL), or Hodgkin's lymphoma (HL), extranodal NK-T cell lymphoma (LENKT) - nasal type, diffuse large B cell lymphoma (DLBCL), nasopharyngeal carcinoma (NC) and autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS).

Its discovery occurred in 1964, in the Burkitt's lymphoma of a child from Sub-Saharan Africa and it is known that approximately 90% of healthy adults carry this virus. The programs found in these individuals are the same as those found in individuals who have developed associated tumors. The transmission of the virus is most often carried out through saliva although it can occur through other routes, such as transplants and blood transfusions. Primary EBV infection has two peaks of incidence, one during childhood and the other during adolescence/early adulthood, with the former usually being asymptomatic and the latter mostly manifested by IM. IM is a benign disease that usually requires only symptomatic treatment, based on the relief of fever and pain, hydration and rest. The diagnosis of primary EBV infection is usually performed by the “monospot test”. However, in some cases testing specific antibodies against EBV is necessary due to the strong suspicion of EBV infection despite a negative monospot test. The autoimmune pathology most associated with EBV is MS and it is known that individuals who develop IM during the course of primary infection have a 2-3 times higher risk of developing MS.

This dissertation intends to revise the existing literature, in order to better characterize the epidemiology, symptoms, pathophysiology and mechanisms of action of the EBV in the most frequently associated benign and malignant diseases, as well as the therapeutic and/or preventive strategies based on the mechanism by which the virus is associated with each pathology.

## **Keywords**

Epstein-Barr virus; Physiopathology; Epidemiology; Infectious Mononucleosis; Neoplasias.



# Índice

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS .....	IV
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
ÍNDICE .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XII
LISTA DE TABELAS .....	XIV
LISTA DE ACRÓNIMOS .....	XVI
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Resenha Histórica, Epidemiologia e Transmissão do Vírus Epstein-Barr ....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Fisiopatologia, Características do Vírus e Futuro Risco Multifuncional ....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Diagnóstico .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS E QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Desenho da Revisão .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Fontes de Informação.....</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>4.1. Patologias Benignas Associadas ao EBV .....</b>	<b>12</b>
4.1.1. Mononucleose Infeciosa (MI).....	12
4.1.2. Infecção crónica ativa por EBV (CAEBV).....	17
<b>4.2. Doenças Autoimunes Associadas ao EBV.....</b>	<b>19</b>
4.2.1. Esclerose Múltipla (EM).....	19
<b>4.3. Neoplasias Associadas ao EBV.....</b>	<b>22</b>
4.3.1. Linfoma de Burkitt (LB).....	22
4.3.2. Linfoma de Hodgkin (LH).....	24
4.3.3. Doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT).....	26
4.3.4. Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB).....	27
4.3.5. Linfoma Extranodal de células NK-T (LENKT)- tipo nasal.....	28
4.3.6. Carcinoma Nasofaríngeo (CN).....	30
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>32</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>35</b>



# Lista de Figuras

Figura 1. Representação da infecção por EBV e doenças associadas.....	2
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de vida do EBV em portadores imunocompetentes.....	4
Figura 3. Representação do mecanismo de atuação da proteína viral LMP1 na sinalização celular.....	7
Figura 4. Serologia do EBV durante a infecção aguda.....	10



## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Antígenos expressos pelo EBV durante a fase de latência para evitar a resposta imune do hospedeiro assim como as funções dos mesmos.....	7
Tabela 2. Testes diagnósticos para MI.....	14



## Lista de Acrónimos

AID	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>
ALT	Enzima alanina aminotransferase
AP-1	Proteína de ativação 1
AST	Enzima aspartato aminotransferase
BARF1	<i>homologous to intercellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1)</i>
Bcl-2	Proteína do linfoma de células B 2
BCRF1	<i>Viral protein IL-10 (vIL-10)</i>
BHRF1	<i>Viral homologous to Bcl-2 protein</i>
CAEBV	Infeção crónica ativa por EBV
CAR	Recetor de antígeno quimérico
CD4	<i>Cluster de diferenciação 4</i>
CD8	<i>Cluster de diferenciação 8</i>
CD21	<i>Cluster de diferenciação 21</i>
CD40	<i>Cluster de diferenciação 40</i>
CD56	<i>Neural-Cell Adhesion Molecule</i>
CHOP	Esquema de quimioterapia com ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina, prednisona
CN	Carcinoma nasofaríngeo
CRS	<i>Células de Reed-Sternberg</i>
CTAR	<i>C-terminal domain of LMP1</i>
DLPT	Doença linfoproliferativa pós-transplante
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EA	Antígenos precoces
EA-D	Antígenos precoces difusos
EA-R	Antígenos precoces restritos
EBERs	<i>Epstein-Barr encoding regions</i>
EBNAs	Antígenos nucleares do EBV
EBV	<i>Epstein-Barr virus</i>
EM	Esclerose Múltipla
Gp42	Glicoproteína 42 do envelope viral
Gp110	Glicoproteína 110 do envelope viral
Gp350	Glicoproteína 350 do envelope viral
HHV-6	Herpes vírus humano 6
IFN- $\alpha$	Interferão Alfa
IFN- $\gamma$	Interferão Gamma
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
ILs	Interleucinas
JAK-STAT	<i>Janus kinase/signal transducers and activators of transcription</i>
JNK-AP1	<i>Janus kinase-fator de transcrição 1</i>
KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptor</i>
LB	Linfoma de Burkitt

LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDGCB	Linfoma difuso de grandes células B
LENKT	Linfoma extranodal de células NK-T
LH	Linfoma de Hodgkin
LHc	Linfoma de Hodgkin clássico
LHF2	Linfocitose hemofagocítica familiar 2
LMPs	Proteínas de membrana latente
MHC	Complexo <i>major</i> de Histocompatibilidade
MI	Mononucleose Infeciosa
MO	Medula óssea
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
NK/T	<i>Natural Killer T</i>
NKG2A	<i>Type A receptor for natural killer cells</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PD-L1	Ligando da proteína de morte celular programada 1
PDGF-alfa	Fator de crescimento alfa derivado de plaquetas
PET-TC	Tomografia por emissão de positrões em conjunto com uma tomografia computadorizada
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SMILE	Esquema de quimioterapia com esteroides, metotrexato, ifosfamida, L-asparaginase e etoposido
SNC	Sistema Nervoso Central
Th	Células <i>T-helper</i>
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i>
TNM	Sistema de estadiamento oncológico baseado em: Tumor, Nódulos linfáticos e Metástases
TRAF	<i>Tumoral necrosis factor (TNF) receptor-associated factor</i>
VCA	Antigénio capsular do vírus
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VZV	Vírus varicela-zóster
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
XMEN	Imunodeficiência ligada ao X com defeito de Mg <sup>2+</sup>
ZEBRA	Proteína de lise precoce do EBV



# 1.Introdução

## 1.1.Resenha Histórica, Epidemiologia e Transmissão do Vírus Epstein-Barr

O Epstein-Barr virus (EBV) foi descoberto pela primeira vez em 1964 num linfoma de Burkitt de uma criança originária da África Subsariana. Aproximadamente 90% dos adultos saudáveis são portadores do EBV, verificando-se que programas de infecção do EBV que se encontram em malignidades associadas ao vírus também se encontram nos portadores saudáveis <sup>1</sup>. Trata-se de um agente causador de 2% dos tumores a nível mundial, especialmente linfomas e carcinomas de células epiteliais <sup>1</sup>.

As infeções por EBV são mais comuns nos primeiros anos de vida, contudo, têm um segundo pico de incidência na adolescência. A mononucleose infecciosa (MI) é frequentemente observada em adultos jovens nos países desenvolvidos, ao contrário do que ocorre nos países em desenvolvimento, onde as condições de higiene, muitas vezes precárias, facilitam a propagação da infeção e levam a que a MI se apresente em indivíduos com idades mais precoces <sup>2</sup>.

A transmissão viral ocorre mais frequentemente através da saliva, sendo transmitido frequentemente de adultos assintomáticos para crianças e de adulto para adulto através do beijo. A transmissão também pode ocorrer, eventualmente, através de transfusões sanguíneas e transplantes de medula óssea (MO). Mais de 90% dos casos EBV seropositivos, contudo assintomáticos, possuem o vírus nas suas secreções orofaríngeas. Os pacientes imunocomprometidos, assim como aqueles com MI, possuem níveis mais elevados nas suas secreções orais, o que facilita a transmissão <sup>2</sup>.

## 1.2.Fisiopatologia, Características do Vírus e Futuro Risco Multifuncional

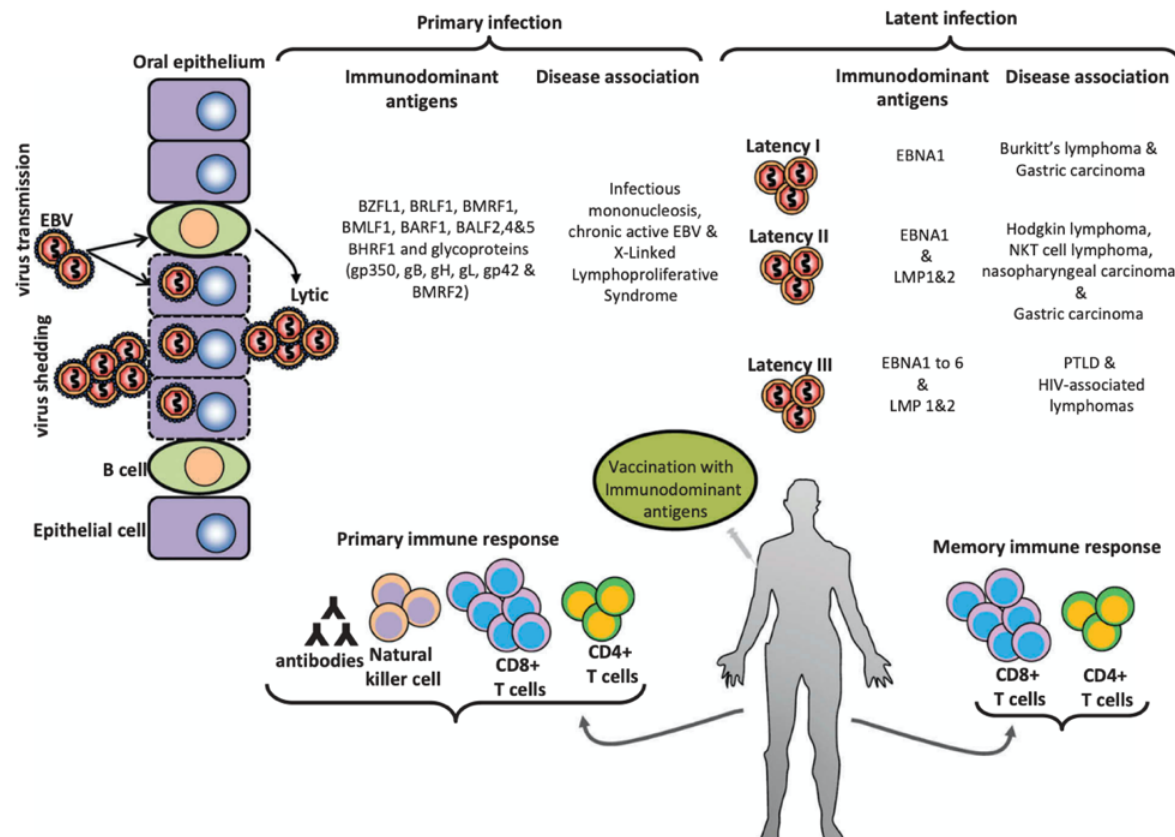
Trata-se de um *gamma-herpesvirus* (membro da família *Herpesviridae*, sub-família *Gammaherpesviridae*), o *gamma-herpesvirus* humano 4, um vírus de *Deoxyribonucleic acid* (DNA) e o único capaz de imortalizar rapidamente células humanas, nomeadamente as células B, estimulando um crescimento contínuo destas enquanto linhagens celulares linfoblásticas após infeção *in vitro* <sup>1</sup>. Existem dois genótipos distintos de EBV (o tipo 1 e o tipo 2, diferenciados com base em alterações no gene EBNA2), que não são distinguíveis pelos testes serológicos convencionais <sup>2 3</sup>. O genoma do EBV está incluído numa nucleocápside, rodeada de uma membrana viral e o seu genoma codifica aproximadamente

100 proteínas virais incluindo fatores de transição, fatores de replicação e proteínas estruturais. Assim, a expressão das proteínas codificadas pelo vírus varia de acordo com o tipo, a diferenciação e o estado de ativação da célula-alvo. O EBV apresenta um notável tropismo para as células epiteliais e para as células B, particularmente em localizações submucosas, acedendo às mesmas através de uma via de transcitose ou entre as células epiteliais com redes de tight-junctions incompletas nas criptas amigdalinas/tonsilares <sup>1 4</sup>.

Este vírus está associado a um vasto leque de malignidades, desde tumores do músculo liso, carcinomas nasofaríngeos, linfoma de Hodgkin, a linfomas primários de células B, e também a linfomas de células T/Natural Killer (NK) entre outros <sup>1 2</sup>.

Sabe-se que, dependendo das circunstâncias em que ocorre a infecção primária, de imunodeficiências primárias e de alterações que ocorrem no compartimento imune durante os primeiros dez anos de vida, ser portador persistente de EBV pode influenciar a gênese tumoral e o evento de MI pode, mais tarde, vir a associar-se ao linfoma de Hodgkin. Assim, torna-se evidente que uma possível prevenção para malignidades futuras possa estar localizada ao nível da infecção primária <sup>1</sup>.

Um esquema figurativo da infecção por EBV, antígenos e células envolvidas e possíveis doenças associadas à infecção primária e latente encontra-se representado na **Figura 1**.



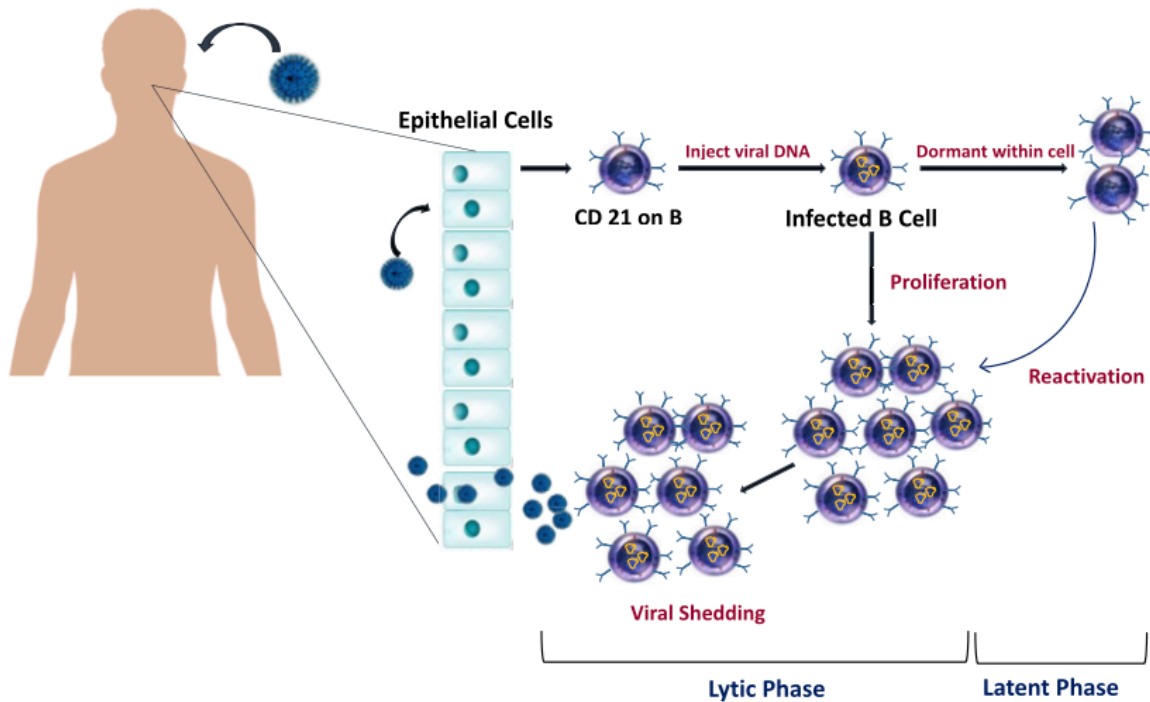
**Figura 1.** Representação da infecção por EBV e de algumas doenças associadas <sup>5</sup>.

A infecção provoca dois tipos de resposta imunitária no hospedeiro, a resposta humoral e a resposta celular, sendo que a primeira consiste na produção de anticorpos/imunoglobulinas G (IgG) contra o antígeno capsular do vírus (VCA IgG) e contra um antígeno precoce (EA-IgG) <sup>4</sup>.

O EBV infeta células B, células epiteliais, células NK, células NK/T (*natural killer T*), macrófagos, monócitos e miócitos e também se encontra presente em secreções cervicais, no sêmen e na mucosa genital. Tal como todos os vírus *herpesviridae*, este é capaz de executar diferentes programas de expressão gênica, classificados dentro de duas grandes fases, a lítica e a latente. Numa fase inicial da infecção por EBV, os linfócitos T reguladores, as células NK e os linfócitos T citotóxicos são a primeira barreira de controlo da proliferação dos linfócitos B infetados pelo vírus, e só posteriormente no decorrer da infecção é que se verifica um aumento do número de linfócitos T citotóxicos específicos contra antígenos virais com capacidade de reconhecer os antígenos nucleares do EBV (EBNAs), proteínas de membrana latente (LMPs) destruindo, assim, as células infetadas pelo EBV <sup>2 4</sup>.

Quando se trata de um indivíduo imunocompetente, o vírus propaga-se através da saliva. De seguida, entra em contacto com o epitélio amigdalino onde inicia a fase lítica. Os linfócitos B *naive* infetados tornam-se linfoblastos ativos e migram para os folículos dos nódulos linfáticos para iniciar uma reação no centro germinativo folicular através de instauração do programa de “latência III”. A infecção latente é mediada primariamente por uma população de linfócitos T CD8+ (*Cluster* de diferenciação 8) citotóxicos que reconhecem antígenos nucleares do EBV e que se podem observar como linfócitos atípicos no esfregaço de sangue periférico de um paciente com MI. A proliferação destas células T expressa-se através de linfocitose periférica, linfadenopatia e esplenomegalia. Acredita-se que estas células, quando ativadas, contribuem para os sintomas associados à MI através da secreção de Interferão Gamma (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina-2 (IL-2) <sup>3 4</sup>.

Uma representação esquemática do ciclo de vida do EBV em portadores imunocompetentes encontra-se representado na **Figura 2**.



**Figura 2.** Representação esquemática do ciclo de vida do EBV em portadores imunocompetentes. A infecção tem início nas células epiteliais e células B *naïve* da cavidade oral. O vírus vai replicar-se nestas células e promover a sua proliferação. Mais tarde a fase de latência entra em funcionamento. Posteriormente enquanto as células circulam no organismo, as células B de memória sofrem reativação e provocam a disseminação do EBV <sup>3</sup>.

Os pacientes imunocomprometidos possuem elevado risco de desenvolverem tumores de células B induzidos pelo EBV devido à ausência da vigilância imune pelas células T, o que permite uma expressão de genes do EBV sem restrições, assim como um crescimento autónomo de células infetadas pelo mesmo (Padrão de latência III). Nestes pacientes, os linfomas associados ao EBV mostram formas mais restritas de expressão génica latente, refletindo um mecanismo patogénico mais complexo e que envolve cofatores adicionais e ocorre anos após a infeção primária. A maioria dos tumores de não células B de início tardio, tem esta origem e provavelmente inicia-se num clone de células infetadas por EBV que atinge a oncogénese após concluir as alterações complementares e os sinais de crescimento, desde um microambiente, alterações secundárias como a falha do sistema imunológico, eventos genéticos aberrantes e a estimulação da proliferação de células B por outras infeções <sup>4</sup>.

Previamente à entrada do vírus na célula B, a glicoproteína 350 do envelope viral (gp350), une-se ao recetor do vírus, *cluster* de diferenciação 21 (CD21), presente na superfície da célula B, sendo esta a via predominante para o vírus entrar nas células B, não sendo, contudo, a única. Há mais 3 mecanismos de união entre o vírus e as células B que

não incluem nem a gp350 nem o CD21. O mais relevante destes três baseia-se na existência de uma glicoproteína, a glicoproteína 42 do envelope viral (gp42), que fixa o EBV às moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) classe II, servindo este como cofator para a infecção de células B. Pacientes com agammaglobulinemia ligada ao X não possuem células B maduras e por essa razão as suas células B não podem ser infetadas pelo EBV <sup>4</sup>.

As células B *naive* da submucosa expressam as oito proteínas do EBV latente (6 nucleares (EBNAs) e 2 membranares (LMPs)). São estas proteínas que levam à proliferação das células B, principalmente através das proteínas EBNA2 e LMP1, e ao bloqueio da apoptose de células B em proliferação (que estavam programadas para sofrer morte celular), principalmente através das proteínas EBNA3A, EBNA3C e LMP2. Esta fase é denominada de “Padrão de latência III da infecção” e também pode ser encontrada nas linhagens celulares linfoblásticas. As células B ativadas pela via da infecção por EBV entram depois no centro germinativo de modo a seguirem o ciclo fisiológico das células B. As células B, nos centros germinativos, expressam apenas 3 proteínas do EBV, a EBNA1, LMP1 e LMP2, proteínas do “Padrão de latência II”. A produção destas proteínas assegura a sobrevivência das células B infetadas de modo a se diferenciarem e persistirem como Células B de memória, sem qualquer expressão de proteínas do EBV. A proliferação homeostática destas células B de memória requer a expressão transitória de EBNA1, que assegura a replicação do genoma viral e a distribuição a células filhas durante a proliferação, constituindo o “Padrão de latência I”. A diferenciação dos plasmócitos a partir deste *pool* de células B de memória induz a replicação lítica do EBV que pode, posteriormente, infetar as células epiteliais e provocar outra amplificação das partículas virais através de uma replicação lítica nessas células, assim como a propagação para a saliva e possível transmissão <sup>1</sup>.

Os “padrões de latência I,II e III”, podem ser encontrados em malignidades associadas ao EBV, tal como o linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin e linfomas imunoblásticos, respetivamente. No entanto, com a diminuição da expressão de antigénios do EBV, as células tumorais requerem mutações compensatórias para manter a sua proliferação e/ou a sua resistência à morte celular. Pensa-se que algumas delas são induzidas por maquinaria somática de hipermutação do centro germinativo de células B, o que também é, em parte, induzido diretamente pelos antigénios do EBV latente <sup>1</sup>.

Deste modo, os programas de expressão génica de tumores associados ao EBV já estão presentes em portadores de EBV assintomáticos, assim como o mecanismo para mutações tumorais adicionais que é em parte induzido pela infecção pelo EBV <sup>1</sup>.

As células B infectadas atingem os nódulos linfáticos, sangue periférico e outros locais com mucosa (p.e. mucosa gástrica e outras membranas mucosas associadas a locais com tecido linfoide em indivíduos saudáveis). O EBV persiste no hospedeiro infectado num estado latente a longo-prazo, denominado estado não-letal de portador. Este estado é perpetuado por uma reativação periódica da fase latente para a fase lítica levando a uma baixa disseminação através da propagação de viriões das superfícies mucosas, ao longo da vida do hospedeiro <sup>4</sup>.

Nos países em desenvolvimento, a infecção primária por EBV ocorre durante os primeiros anos de vida e habitualmente é assintomática. No entanto, em países desenvolvidos, há uma tendência para a infecção primária ser mais tardia, com maior proporção de infectados na população de adolescentes e adultos-jovens manifestando-se, habitualmente, sob a forma de infecções autolimitadas, referidas como MI <sup>4</sup>.

A persistência do EBV e o seu potencial oncogénico podem ser devidos a vários fatores, tais como:

- 1- Capacidade do vírus para manter o genoma viral nas células, sem colocar em perigo a vida do hospedeiro;
- 2- Estratégias que permitam invadir o sistema imunitário do hospedeiro;
- 3- Habilidade para ativar as vias de controlo de crescimento celular.

O EBV codifica duas proteínas, uma homóloga da Interleucina-10 (IL-10) - *homologous to intercellular cell adhesion molecule 1* (BCRF1), que permite a inibição viral persistente da síntese de IFN- $\gamma$  e uma *viral protein IL-10* (BARF1), que inibe a expressão do IFN-2 $\alpha$  pelos monócitos. *In vitro*, IFN- $\gamma$  e o IFN-2 $\alpha$  inibem o crescimento das células infectadas por EBV. Desse modo, a BCRF1 e a BARF1 podem ajudar a evitar a resposta imune durante a infecção aguda por EBV ou a reativação viral em células latentes infectadas <sup>4</sup>. O vírus também codifica duas proteínas que inibem a apoptose, *viral homologous to Bcl-2 protein* (BHRF1) e a proteína de membrana latente LMP1. Esta última é essencial na transformação dos linfócitos B em linhas celulares linfoblastóides e estimula a expressão de várias proteínas celulares que inibem a apoptose, incluindo a Bcl-2 (Proteína do linfoma de células B <sup>2</sup>), e ativando a via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), inibindo as células infectadas de cumprirem o programa de morte celular programada e estimulando assim a sua proliferação <sup>3 4</sup>.

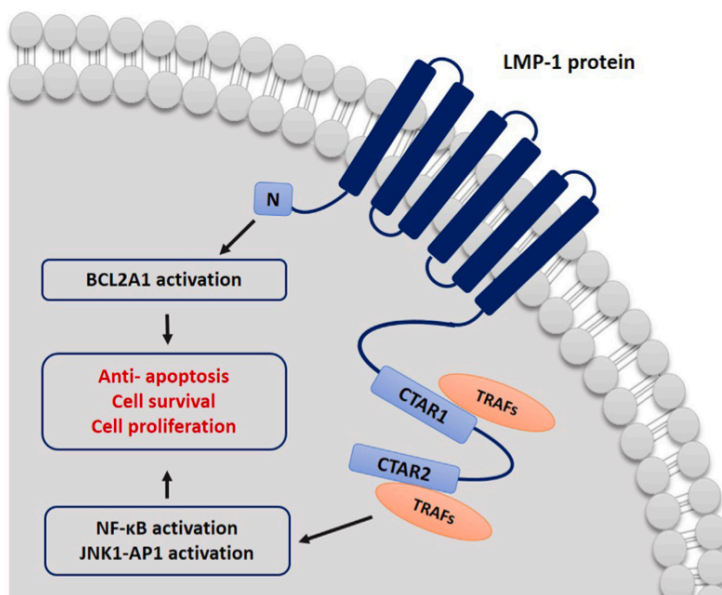
Um resumo dos antígenos expressos pelo EBV encontra-se representado na **Tabela 1**

1.

**Tabela 1.** Antígenos expressos pelo EBV durante a fase de latência para evitar a resposta imune do hospedeiro assim como as funções dos mesmos 4. EBNA: Antígenos nucleares do EBV; LMP: Proteína de Membrana Latente; EBER: *Epstein-Barr encoding regions*.

<b>EBNA</b>
EBNA-1: genoma viral é mantido, é essencial para imortalizar as células B in vitro
EBNA-2: essencial para a imortalização de células B in vitro
EBNA-3A: essencial para a imortalização de células B in vitro
EBNA-3B
EBNA-3C: essencial para a imortalização de células B in vitro
EBNA-LP
<b>LMP</b>
LMP-1: aumenta a proliferação das células B, protegendo-as contra a apoptose e induz o fenótipo linfoblástico
LMP-2A: previne a ativação celular e a entrada na fase lítica
LMP-2B
<b>EBER</b>
EBER-1: regula a atividade da Proteína quinase C e regula positivamente o Bcl-2 nas células do Linfoma de Burkitt
EBER-2: regula a atividade da proteína quinase C e regula positivamente o Bcl-2 nas células do Linfoma de Burkitt

Uma representação esquemática do mecanismo de atuação da proteína viral LMP1 na sinalização celular encontra-se representado na **Figura 3**.



**Figura 3.** Representação do mecanismo de atuação da proteína viral LMP1 na sinalização celular 3. CTAR: C-terminal domain of LMP1; TRAF: *Tumoral necrosis factor (TNF) receptor-associated factor*; NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B; JNK-AP1: Janus kinase-fator de transcrição 1.

### 1.2.1. Infecção primária por EBV

No que concerne ao período de incubação: o vírus infeta as células epiteliais amigdalinas, tal como as células B que estão no parênquima amigdalino. Observou-se, *in vitro*, que o vírus possui um tropismo viral polar dependente do tipo celular no qual se replica. É neste período que o vírus se translada da cavidade oral para o sangue. O genoma viral é detetado no sangue pelo menos 1 semana antes do início dos sintomas onde, provavelmente, permanece em fase de latência nos linfócitos B de memória <sup>6</sup>.

Relativamente à fase aguda da infecção, verifica-se uma elevada carga viral na cavidade orofaríngea e no sangue aquando o início dos sintomas de MI, facto que se acompanha pela produção de anticorpos anti-VCA e uma exponencial expansão dos linfócitos T CD8+. A resposta destes linfócitos é importante no controlo dos linfócitos B infetados. Durante a MI, elevados níveis de linfócitos T CD8+ circulantes são específicos para o EBV e direcionados para as proteínas de fase lítica, especialmente para os estadios iniciais do ciclo de lise celular. Os linfócitos específicos para antígenos de aparecimento mais tardio no ciclo, surgem em fases mais avançadas da MI. Na fase de latência viral, verifica-se uma maior dependência do tipo de MHC expresso, sendo que os mais prevalentes são aqueles que resultam de proteínas expressas na fase de latência, especialmente EBNA2 e EBNA3, embora alguns pacientes também desenvolvam linfócitos T CD8+ específicos para antígenos menos expressos, tais como o EBNA1. Ambos os linfócitos T CD8+ e CD4+ (*Cluster* de diferenciação 4) necessitam contacto célula a célula, de modo a ficarem ativos e poderem efetuar as suas funções. Apesar do número total de linfócitos T CD4+ não aumentar significativamente durante a MI, existe evidência de que estas células também são ativadas e participam no controlo da infecção dos linfócitos B. Os linfócitos T CD4+ que respondem ao EBNA1 já se desenvolvem muito tardiamente, o que ajuda a explicar o atraso na resposta das IgG EBNA1 <sup>6</sup>. Observou-se que as células NK destroem preferencialmente as células infetadas pelo vírus quando ele entra na fase lítica. Uma depleção neste tipo celular durante a MI não apresentou efeitos significativos no prognóstico, ao contrário do efeito que uma depleção prévia à infecção pode provocar. É possível que as células NK circulantes no sangue durante a fase sistémica da MI sejam menos importantes que as presentes na orofaringe durante a fase inicial da infecção. Num estudo pediátrico em pacientes com MI, verificou-se que células NK que eram *neural-cell adhesion molecule negative* (CD56-), *type A receptor for natural killer cells positive* (NKG2A+) e *Killer immunoglobulin-like receptor negative* (KIR-) proliferavam especialmente como resposta a células infetadas durante a fase aguda da infecção. Verificou-se que, pacientes com imunodeficiências que envolvem os linfócitos T e as células NK e/ou os seus mecanismos de citólise, estão associados a apresentações severas da infecção por este vírus. Estas

imunodeficiências incluem a linfocitose hemofagocítica familiar 2 (LHF2), síndrome linfoproliferativa ligada ao X, deficiência de *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) e imunodeficiência ligada ao X com defeito de Mg<sup>2+</sup> (XMEN). Sabe-se que as células NK amigdalinas possuem uma eficácia superior às do sangue periférico. Contudo, são precisas mais investigações acerca do processo de reconhecimento destas células perante o EBV e as suas respostas durante a infeção. Não se verificou nenhuma relação entre a quantidade de cópias do vírus na cavidade oral e a severidade da doença <sup>6</sup>.

No que concerne à fase de convalescença: este período da MI dura aproximadamente 3-6 meses após a infeção, ocorrendo um declínio dos níveis de linfócitos T CD8<sup>+</sup> até níveis normais, sendo o vírus mantido em linfócitos B de memória <sup>6</sup>.

### **1.3.Diagnóstico**

O teste clássico para os anticorpos heterófilos pode ser usado para fazer o diagnóstico de MI. Títulos superiores ou iguais a 40 U/mL fazem o diagnóstico de infeção aguda por EBV em pacientes com sintomas compatíveis com MI, assim como a presença de linfócitos atípicos no hemograma. Contudo, os seguintes factos revelam que o teste não é totalmente fiável, pois pode apresentar-se positivo em apenas 40% dos casos de MI na primeira semana, apresentar-se positivo em 80-90% dos casos na terceira semana, existindo também a possibilidade de os anticorpos serem indetetáveis em crianças com menos de 5 anos de idade, nos idosos ou em pacientes com sintomas atípicos. Assim, torna-se possivelmente necessário repetir o teste, especialmente se este tiver sido efetuado muito precocemente no aparecimento da doença. O teste habitualmente permanece positivo até 3 meses após o início da doença. No entanto, os anticorpos podem detetar-se até 1 ano depois. O “teste *monospot*”, comercializável para os anticorpos heterófilos, possui sensibilidade superior à do teste clássico contudo, falsos positivos podem verificar-se na presença de doenças do tecido conjuntivo, linfoma, hepatite viral e malária <sup>2</sup>.

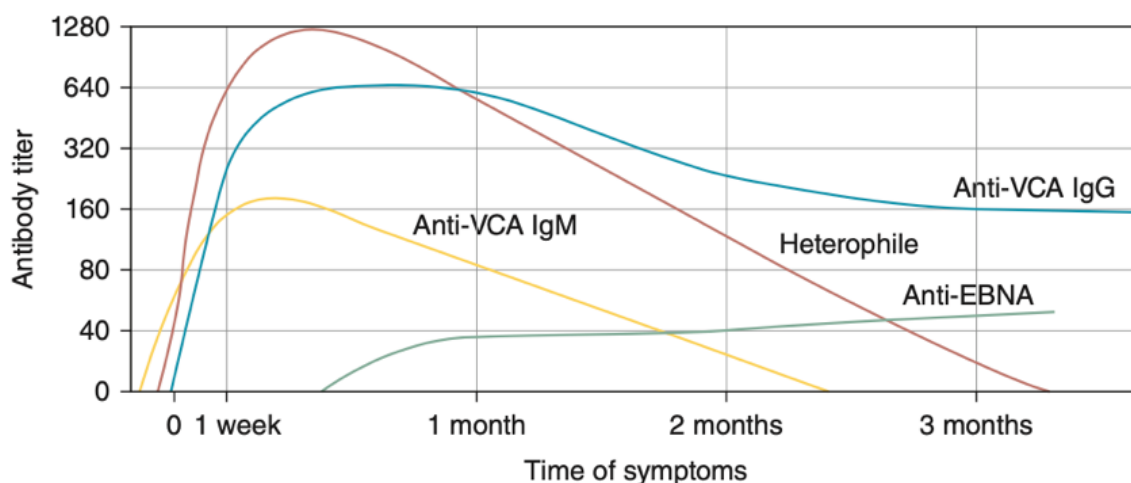
O teste dos anticorpos específicos contra o EBV usa-se nos casos em que há suspeita de uma infeção pelo vírus, apesar dos anticorpos heterófilos serem negativos ou então quando se trata de infeções atípicas. Os títulos de Imunoglobulina M (IgM) e IgG contra o VCA encontram-se elevados no sangue em mais de 90% dos pacientes no início da doença. O anti-VCA IgM é especialmente útil no diagnóstico de MI aguda já que se encontra em títulos elevados apenas durante as primeiras 8 a 12 semanas. O anti-VCA IgG persiste toda a vida, sendo adequado para aceder a exposição prévia ao vírus. Os anticorpos contra o EBNA tornam-se detetáveis relativamente tarde, 3-6 semanas após o início da doença, na maioria dos casos de infeção aguda por EBV e persistem por toda a vida. Em pacientes com

imunodeficiências e pacientes com infecção crônica ativa por EBV, estes anticorpos podem ser indetetáveis <sup>2</sup>.

Os anticorpos contra antígenos precoces difusos (EA-D) estão presentes em 70% dos pacientes com MI. A presença destes anticorpos é altamente provável se a doença for severa e persistem habitualmente apenas 3-6 meses. Os seus títulos encontram-se elevados também em pacientes com carcinoma nasofaríngeo ou com infecção crônica ativa por EBV. Os anticorpos contra antígenos precoces restritos (EA-R) são raramente encontrados em pacientes com MI, mas são frequentemente encontrados no Linfoma de Burkitt da forma endêmica ou na infecção crônica ativa por EBV. As imunoglobulinas A (IgA) contra EBV são úteis na identificação de pacientes com carcinoma nasofaríngeo e de indivíduos com elevado risco de contrair a doença <sup>2</sup>.

Outro aspeto muito importante é a deteção de DNA, *ribonucleic acid* (RNA) ou de proteínas do EBV, úteis para demonstrar a associação do vírus a várias neoplasias. O teste da *polymerase chain reaction* (PCR) tem sido útil para detetar DNA do EBV no líquido cefalorraquidiano (LCR) de alguns pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), linfomas, e para monitorizar a quantidade de DNA do vírus no sangue de pacientes com doenças linfoproliferativas. A cultura de EBV dos lavados orais ou do sangue não se demonstrou útil para auxiliar o diagnóstico de infecção aguda pelo vírus, já que o mesmo persiste para toda a vida na orofaringe e nas células B do indivíduo infetado <sup>2</sup>.

Um gráfico referente às serologias e evolução em continuidade durante a fase aguda da infecção encontra-se representado na **Figura 4**.



**Figura 4.** Serologia do EBV durante a infecção aguda. IgM anti-VCA são detetáveis na fase ativa da infecção e declinam na convalescência. IgG anti-VCA aumentam em simultâneo com as IgM anti-VCA mas permanecem perpetuamente positivas, sendo indicadores de infecção passada. Os EBNA são detetados numa fase mais tardia da infecção e também permanecem positivos <sup>2</sup>.

## 2. Objetivos e Questão de Investigação

A problemática em que assenta a presente revisão da literatura tem por base a compreensão da fisiopatologia e da transversalidade do EBV, assim como a sua interação e influência em futuras patologias, alocadas a distintos sistemas e órgãos.

## 3. Metodologia

### 3.1. Desenho da Revisão

A abordagem metodológica assentou numa revisão da literatura, que permitiu a análise de uma ampla diversidade de artigos de revisão, revisões da literatura científica e revisões sistemáticas da literatura, tendo como objetivo rever e abordar os temas mais relevantes para a compreensão da infeção pelo EBV e da sua ação nas patologias a ele mais frequentemente associadas.

### 3.2. Fontes de Informação

A pesquisa de literatura do presente estudo foi efetuada formalmente na base de dados MEDLINE, utilizando como interface a PubMed.

Foram considerados revisões que preenchessem os seguintes critérios:

- Data de publicação – incluir artigos publicados nos últimos 5 anos (novembro de 2015-novembro de 2019);
- Idioma – incluir os artigos publicados em inglês;
- Espécie – incluir artigos apenas acerca da espécie humana;
- Disponibilidade do texto – incluir todos os artigos disponíveis.

A pesquisa foi conduzida na língua inglesa, utilizando a conjugação dos seguintes termos: “*Epstein-Barr Virus*”, “*epidemiology*”, “*physiopathology*”, “*Burkitt Lymphoma*”, “*CAEBV*”, “*Extranodal NK/T-cell lymphoma*”, “*Hodgkin Lymphoma*”, “*Infectious mononucleosis*”, “*Multiple sclerosis*”, “*Nasopharyngeal carcinoma*”, “*Positive diffuse large B-cell lymphoma*” e “*Post-transplant Lymphoproliferative disease*”.

Em conjugação recorreu-se ao manual “*Harrison’s principles of internal medicine-20th edition*”.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Patologias Benignas Associadas ao EBV

Verifica-se que o EBV está associado mais frequentemente a duas principais patologias benignas, uma considerada de duração temporária, a MI, e a observada a longo prazo, a infecção crónica ativa por EBV (CAEBV), com evolução potencialmente maligna se não controlada, vigiada e submetida a tratamento <sup>4 7</sup>.

#### 4.1.1. Mononucleose Infeciosa (MI)

A MI é a alteração clássica relacionada com a infecção por EBV <sup>8</sup>. Durante a infância, a infecção primária é habitualmente indistinguível de outras patologias virais. Em alguns doentes manifesta-se como crescimento não-doloroso dos nódulos linfáticos e proliferação do tecido linfóide da orofaringe, sendo que a infecção da orofaringe é causada por uma anterior infecção lítica, localizada, seguida por uma infecção dos linfócitos B circulantes. Esta apresenta um período de incubação de 30-50 dias e tem expressão clínica em mais de 70% dos adolescentes expostos a secreções orofaríngeas contaminadas com o EBV <sup>4</sup>. Ocorre envolvimento dos nódulos linfáticos e dos tecidos linfóides extranodais da cabeça e pescoço [anel linfático de Waldeyer, envolvendo as amígdalas palatinas (mais frequentemente as linguais e adenóides)] <sup>8</sup>. A tríade clássica de apresentação clínica da MI caracteriza-se por febre, faringite e linfadenopatia cervical <sup>9</sup>.

Trata-se, pois, de uma doença linfoproliferativa autolimitada. Durante a fase prodrómica, o paciente apresenta sintomatologia inespecífica, fadiga, anorexia, sensação de fraqueza generalizada, cefaleia e febre. A apresentação pode manifestar-se por 2 a 3 semanas de febre, faringite com um simples eritema ou faringite associada a exsudado branco acinzentado (30% dos casos e quando presente auxilia o diagnóstico diferencial) e adenopatias cervicais <sup>4</sup>. Em 25-50% dos casos, o paciente pode apresentar petéquias no palato. A presença de esplenomegalia é variável e revelada através de exame físico em aproximadamente 17% dos casos e, se usados métodos de imagem, estes são 100% eficazes na sua deteção <sup>4</sup>. Menos frequentemente, pode haver obstrução da via aérea, dor abdominal, rash cutâneo (aproximadamente 5% dos casos) que pode ser macular, petequial, escarlatiniforme, urticariforme ou do tipo eritema multiforme, icterícia, hepatomegalia e edema palpebral <sup>4</sup>. Também se pode verificar um aumento dos níveis das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que retornam aos valores da normalidade após sensivelmente 20 dias. As adenopatias cervicais podem ser proeminentes nos triângulos cervicais anterior e posterior, o que pode auxiliar na diferenciação da MI de uma amigdalite bacteriana, que habitualmente se caracteriza por uma adenopatia limitada

à cadeia cervical ântero-superior <sup>9</sup>. Contudo, a MI pode complicar-se com trombocitopenia, neutropenia, rotura esplénica, hepatite fulminante, obstrução da via aérea por hipertrofia amigdalina e comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC) <sup>4</sup>.

Há uma resposta imune primária que envolve células T contra as células B infetadas pelo vírus. Quando há ativação de linfócitos B surgem anticorpos heterófilos (IgM, IgG contra antígenos capsulares do EBV) no plasma e posteriormente ocorre uma seroconversão contra os antígenos nucleares do EBV. O programa de latência expresso nos linfócitos B infetados de pacientes com MI, é o de latência III <sup>4</sup>. Um teste de *Paul-Bunnell* (dos anticorpos heterófilos) positivo ou testes sorológicos específicos são importantes para avaliar a presença da infeção e para determinar se se trata de um fenómeno agudo ou de um evento passado <sup>8</sup>. A presença de linfocitose em mais de 50% dos casos, linfócitos atípicos em mais de 10% dos casos e anticorpos heterófilos positivos permitem reconhecer adequadamente os casos de MI de etiologia associada ao EBV <sup>4</sup>. No entanto, para diagnosticar MI por EBV, os métodos com maior exatidão são os testes para anticorpos anti-VCA ou anti-EBNA <sup>10</sup>. Considera-se infeção primária por EBV se forem positivos para o IgM anti-VCA mas não tiverem anticorpos anti-EBNA. Esses, se estiverem positivos sugerem infeção passada. Os níveis de IgG anti-VCA estão elevados na fase aguda, persistindo positivos por toda a vida, no entanto, os IgM anti-VCA negativam após 4 a 6 semanas <sup>9</sup>.

Se os resultados serológicos forem inconclusivos, o teste da PCR e a avaliação da carga viral do EBV são ferramentas úteis para o diagnóstico precoce de MI <sup>9</sup>. Para realizar um diagnóstico definitivo, os critérios de *Hoagland* são os mais citados e declaram que para pacientes com suspeita clínica de MI (febre, faringite e adenopatia), uma linfocitose de pelo menos 50% e no mínimo 10% linfócitos atípicos, o diagnóstico deve ser confirmado através do teste serológico de *monospot* <sup>9</sup>.

Um resumo dos possíveis testes diagnósticos para a MI encontra-se representado na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Testes diagnósticos para MI <sup>9</sup>.

Testes	Sensibilidade	Especificidade	Comentário
Hemograma completo			
Rácio linfócitos/leucócitos > 50% + 10% de linfócitos atípicos	61	95	Um aumento na contagem de linfócitos tende a aumentar a especificidade, contudo a diminuir a sensibilidade
Rácio linfócitos/leucócitos > 35%	84	72	
Teste Monospot	71-98	91-99	Os resultados variam dependendo dos Kits comercializados e são falsos negativos em 25% dos casos de MI em adultos na primeira semana de sintomas
Anticorpos contra antígeno VCA ou EBNA	97	94	Em alguns países podem ter substituído os testes monospot como investigação standard

Aquando o surgimento de MI, torna-se necessário refletir acerca dos vários diagnósticos diferenciais, tais como uma infecção por citomegalovírus, uma infecção pelo herpes vírus humano 6 (HHV-6), síndrome de hipersensibilidade a sulfonamidas, antiepiléticos, alopurinol ou outros fármacos, assim como uma faringite estreptocócica, faringite por Rinovírus, Adenovírus, Coronavírus ou uma manifestação de infecção aguda pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), toxoplasmose, hepatite vírica, rubéola, leucemia aguda ou um linfoma <sup>4 9</sup>. Se o paciente for medicado com ampicilina, nos 10 dias posteriores poderá apresentar-se com um exantema maculopapular em 90 a 100% dos casos. O mesmo exantema pode ocorrer em casos que foram previamente medicados com amoxicilina e antibióticos beta-lactâmicos <sup>4</sup>. Deve fazer-se sempre a distinção entre este rash e um possível rash urticariforme causado por reação alérgica <sup>9</sup>.

Em relação à evolução para malignidade, sabe-se que a resposta imunitária do hospedeiro à infecção aguda por EBV é importante no controlo da mesma. Se a resposta for rápida, normal e assintomática, os linfócitos T reconhecem a ampla variedade de antígenos do EBV e a variedade de linfócitos T é expandida. Se os indivíduos exibem sintomas de MI, a variedade de linfócitos T produzida é mais limitada e reconhecem menos antígenos do EBV. A persistência de genes latentes de EBV nos linfócitos B resulta num estado de portador e na criação de um ambiente favorável à transformação para um linfoma de Células B <sup>8</sup>.

No que concerne ao período de incubação: sabe-se que os linfócitos B infetados pelo vírus, de forma latente, se replicam lentamente e eventualmente penetram nos centros germinativos das amígdalas. Estes linfócitos são posteriormente reativados através do aumento da sinalização dos recetores dos linfócitos B pelas proteínas codificadas pelo vírus, tal como a LMP. A diferenciação destes linfócitos, no centro germinativo, em percursores

de plasmócitos resulta na transmissão viral do EBV de volta à membrana basal das células epiteliais da cavidade oral <sup>11</sup>.

No que concerne à fase aguda, esta caracteriza-se por uma replicação viral exponencial na cavidade oral e no sangue periférico, onde o vírus é primariamente contido nos linfócitos B e apenas pequenas quantidades são libertadas no plasma. Nesta fase até 50% dos linfócitos B de memória em circulação podem estar infetados com EBV, mas assim que o paciente entra em fase de convalescença, o número reduz para 1-50 linfócitos infetados com EBV por 100.000 linfócitos B. O EBV é mantido nos linfócitos B de memória em repouso latentemente infetados em aproximadamente 5-500 cópias por célula. O vírus pode ser encontrado nas células epiteliais orais e no sobrenadante da lavagem oral, o que demonstra que, além das células serem infetadas, o vírus é ativamente libertado para cavidade oral e pode persistir assim durante aproximadamente 1 ano <sup>11 12</sup>.

Sabe-se que, nos EUA, existem no mínimo 125 000 novos casos de MI por ano e 1% dos pacientes com MI desenvolve patologia da medula óssea, do fígado ou patologia neurológica severa <sup>5</sup>. A infeção primária por EBV manifestada através de MI associa-se a um risco aumentado para desenvolver Esclerose Múltipla no futuro e, sabe-se que, pacientes em fase aguda de MI, com uma redução significativa de células dendríticas plasmacitoides e de células dendríticas mielóides na circulação, demonstram um nível superior de gravidade clínica <sup>5</sup>.

Na resposta à infeção aguda por EBV esta induz uma resposta imune adaptativa celular realizada maioritariamente por Linfócitos T CD8+, que reconhecem os antigénios de fase lítica. Após resolução da MI, as respostas a estes antigénios são restringidas e habitualmente compreendem apenas 0.2-2% da população de Linfócitos T CD8+ dos indivíduos infetados de forma latente, enquanto que as respostas aos antigénios de fase latente sofrem um acréscimo e compreendem habitualmente 0.05-1% da população de Linfócitos T CD8+. Durante a fase aguda da MI não há aumento na população total de Linfócitos T CD4+, no entanto, eles são observados no sangue destes pacientes após a estimulação com o conteúdo lisado de células infetadas com o EBV e a resposta destes linfócitos T CD4+ específicos contra EBV, foi detetada contra antigénios de lise incluindo a proteína *ZEBRA* (proteína de lise precoce do EBV), BCRF1, componentes do envelope viral gp350, a glicoproteína 110 do envelope viral (gp110), e antigénios de fase latente EBNA1,2,3C e LMP2, sendo que os linfócitos T CD4+ específicos são positivos para perforinas e possuem também carácter citotóxico. Eles podem atuar diretamente no controlo de lesões replicativas virais. Estes linfócitos específicos para EBV fornecem auxílio para respostas através de anticorpos e uma resposta demorada destes contra EBNA1

encontra-se correlacionada com a resposta, também ela demorada, através de anticorpos contra EBNA1 que se verifica em pacientes com MI <sup>5</sup>. Pacientes com MI que desenvolvem ativação de linfócitos T específicos contra o EBV apresentam esta ativação durante vários meses. Os títulos de IgM VCA são mais elevados na fase “subaguda”, após a redução significativa do número de linfócitos T CD8+ <sup>11</sup>. A resposta dos linfócitos T CD4+ é importante para a posterior produção de anticorpos contra o EBV e quanto mais rápida for a resposta através de anticorpos contra antígenos virais menor gravidade e duração da doença apresentará o paciente <sup>11</sup>.

Salientar que, durante a fase aguda de infeção primária por EBV é raro o desenvolvimento de complicações graves. Estima-se que aproximadamente 1% dos pacientes com MI desenvolve complicações associadas, nomeadamente, obstrução da via aérea devido à inflamação orofaríngea, meningoencefalite, faringite estreptocócica, anemia hemolítica e trombocitopenia. A rotura esplénica é uma das complicações mais raras e incapacitantes da MI, principalmente em atletas, sendo estes aconselhados a retomar a prática de desportos de contacto apenas 3 semanas após a doença, desde que os sinais e sintomas agudos tenham diminuído. Os pacientes com MI podem apresentar dor abdominal devido a linfadenite mesentérica, pressão nas cápsulas hepáticas ou esplénicas devido a organomegalia, ou então colecistite alitiásica. É fulcral em pacientes com dor abdominal no decorrer da MI considerar-se sempre a hipótese de rotura esplénica <sup>11</sup>.

Também, numa percentagem indeterminada de pacientes sem razões genéticas definidas para um controlo inadequado do vírus, a infeção primária por EBV pode resultar numa doença multissistémica crónica. Estes apresentam um perfil persistente que se traduz em índices negativos de VCA IgM, índices elevados de VCA IgG e índices moderadamente elevados de EBNA-1 IgG. Aparenta haver dois padrões clínicos de MI crónica, sendo que o primeiro padrão consiste na recuperação da doença inicial e persistência ou recorrência dos sintomas que se desenvolvem meses a anos após a MI aguda. O segundo padrão consiste numa doença contínua “*mono-like*” com duração indefinida <sup>11</sup>.

Relativamente à prevenção e eventual terapêutica, alguns ensaios clínicos avaliaram estratégias de desenvolvimento de uma vacina programada para induzir respostas imunes celulares e/ou humorais, sugerindo que uma vacina contra o EBV tem a possibilidade de conferir proteção contra a MI e reduzir neoplasias associadas ao EBV, sem se adquirir contudo uma imunidade esterilizante <sup>5</sup>.

Importa salientar também que o tratamento da MI com corticosteroides na fase aguda da doença é controverso, mas admite-se a vantagem do seu uso em casos de obstrução

da via aérea ou em casos onde se verificam fenómenos autoimunes, tais como anemia e/ou trombocitopenia<sup>11</sup>. Os efeitos adversos incluem casos de celulite periamigdalina, início agudo de Diabetes Mellitus e sequelas neurológicas, assim como uma possível diminuição da libertação da carga viral <sup>6 9</sup>. Por se tratar de uma infeção de causa viral, na maioria dos casos, o tratamento consiste no repouso, hidratação, analgesia e antipiréticos <sup>9</sup>. Alguns estudos iniciais relatam que o tratamento com aciclovir já demonstrou levar a uma diminuição da disseminação do vírus na orofaringe e que o efeito geral é positivo, verificando-se também a sua utilidade em casos graves com comprometimento das vias aéreas <sup>9</sup>. Contudo, após uma meta-análise de 5 estudos, concluiu-se que a efetividade do aciclovir é incerta na fase aguda da MI, não havendo evidência científica significativa para suportar o seu uso <sup>9 14</sup>. Outros tratamentos com valaciclovir e o ganciclovir mostraram ser promissores no tratamento da MI grave, das suas possíveis complicações e efeitos da MI em imunocomprometidos. No entanto, ainda não são recomendados devido à necessidade de se realizarem mais estudos <sup>9</sup>. A utilização de metronidazol ainda não é recomendada por rotina por serem necessários estudos com amostras mais representativas. Contudo, alguns ensaios clínicos demonstram o seu efeito benéfico na MI grave, suprimindo a flora anaeróbica oral (que caso contrário contribuiria para o processo inflamatório) e reduzindo, assim, os níveis de internamento hospitalar <sup>9</sup>.

A resposta imune, através da produção de anticorpos, é importante para adquirir imunidade protetora. Os pacientes com MI possuem níveis reduzidos de anticorpos contra o antigénio gp350 quando comparados com os pacientes assintomáticos. Verificou-se que, apesar de a vacinação de adultos EBV-seronegativos com uma vacina constituída por gp350 não ter resultado na prevenção da infeção por EBV, a sua implementação alcançou uma redução da sintomatologia de MI. Assim, coloca-se a possibilidade destes anticorpos específicos reduzirem a severidade dos sintomas apesar de não prevenirem a instalação da infeção. Sabe-se também que uma MI fulminante pode ocorrer em casos de indivíduos portadores de imunodeficiências primárias prévias <sup>13</sup>.

#### 4.1.2. Infeção crónica ativa por EBV (CAEBV)

Na evolução da doença há que considerar também a infeção crónica ativa por EBV. Esta foi descrita pela primeira vez em 1986 e é atualmente considerada como o exemplo padrão de doenças linfoproliferativas de linfócitos T ou de células NK associadas ao EBV <sup>15</sup>. É uma doença linfoproliferativa que ocorre mais frequentemente em crianças e adultos jovens e que se caracteriza pela proliferação clonal de linfócitos infetados pelo vírus, podendo evoluir para patologia maligna/neoplásica <sup>16</sup>. Trata-se de uma patologia rara na Europa e Estados Unidos da América, contudo, muito frequente na Ásia e América do Sul e

encontra-se descrita na literatura por uma apresentação recorrente de sintomatologia de MI por mais de 6 meses <sup>4</sup>.

Esta fase da evolução da doença progride, inicialmente, como uma infecção aguda com níveis muito elevados de anticorpos contra EBV ou DNA viral no sangue, associada a evidência histológica de infiltração de órgão com células infetadas pelo vírus, assim como, detecção de proteínas ou ácidos nucleicos do EBV nos tecidos <sup>4</sup>.

Na sua evolução mais grave, o tipo severo foi caracterizado como uma doença específica de mau prognóstico associado às suas características clínicas, virológicas e patológicas. Assim, a sintomatologia na infecção crônica ativa por EBV é geralmente caracterizada por febre prolongada ou intermitente, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, elevação das transaminases, sem doenças definidas subjacentes aquando o diagnóstico, podendo verificar-se também casos de trombocitopenia, anemia, exantema cutâneo, diarreia e uveíte. Assim, esses doentes podem apresentar-se com outras patologias hematológicas, neurológicas, pulmonares, cardíacas, digestivas, oculares e/ou dermatológicas de prognóstico reservado. Sendo frequente no decorrer dessa infecção o desenvolvimento de doenças malignas do foro hematológicas tais como, doenças linfoproliferativas ou linfomas de linfócitos T ou de células NK <sup>15 16 7</sup>.

Pensa-se que, na CAEBV, níveis muito elevados de IgG contra antígenos líticos do EBV [como o antígeno da cápside viral (VCA) e o antígeno precoce (EA)] indicam a presença de replicação aumentada do vírus subjacente, aparentando ser o critério mais importante para a patogénese das várias neoplasias. Verificou-se que a expressão de LMP1 representa um impacto favorável no prognóstico clínico do linfoma extranodal de células NK-T (LENKT) – tipo nasal <sup>16 7</sup>.

Relativamente ao tratamento nesta fase, não se verificou efetividade final com o uso dos tratamentos antivirais (tais como, aciclovir ou ganciclovir), com o uso de agentes que melhoram a imunidade [tais como, interferões (INFs), interleucinas (ILs) ou linfócitos citotóxicos específicos contra o EBV] e/ou com imunossuppressores (tais como, imunoglobulinas ou corticosteroides). O uso da quimioterapia CHOP (ciclofosfamida/doxorubicina/vincristina/prednisona) e/ou altas doses de citarabina não demonstraram nenhum efeito positivo. Não foi demonstrado nenhum tratamento eficaz, exceto o transplante de células estaminais hematopoiéticas em casos de doença linfoproliferativa ou linfoma de linfócitos T ou de células NK. Apesar de se verificar uma incidência consideravelmente elevada de complicações pós-transplante, se o mesmo não fosse efetuado, a mortalidade dos pacientes com CAEBV seria de aproximadamente 10% e

a esperança média de vida de aproximadamente 10-15 anos, maioritariamente devido a falência orgânica, síndrome hemofagocítica e linfoma <sup>7 15 16 17</sup>.

## **4.2. Doenças Autoimunes Associadas ao EBV**

Outro aspeto de suma importância, prende-se com as doenças autoimunes associadas ao EBV. Nesse contexto, é importante uma análise direcionada a confirmar a causalidade e comprovar se o risco de contrair a doença é superior nos pacientes EBV-seropositivos quando comparados com os seronegativos. Nesses últimos, torna-se importante saber se o risco de desenvolver Esclerose Múltipla também aumenta após a infeção por este agente. Atualmente, esta evidência apenas se verificou no caso da Esclerose Múltipla <sup>18</sup>.

### **4.2.1. Esclerose Múltipla (EM)**

A Esclerose Múltipla (EM) é considerada uma doença incapacitante não-traumática (traduzida por um mecanismo inflamatório autoimune), mais comum em adultos jovens, e que provoca desmielinização imunomediada da substância branca no SNC <sup>19 20</sup>. Tem vindo a verificar-se um aumento na incidência e prevalência a nível mundial sem causa específica determinada. É vista como uma doença em dois estágios, com uma inflamação inicial responsável pela parte recorrente-remittente da doença e uma fase mais avançada de neurodegeneração, com uma progressão não recorrente (Esclerose múltipla progressiva) <sup>19</sup>.

Coloca-se a hipótese de vários agentes infecciosos poderem ter um papel subjacente a esta doença, tais como: os herpes vírus, o HHV-6, o vírus varicela-zóster (VZV), o EBV, a *Chlamydia pneumonia*, *Helicobacter pylori* e a *Borrelia burgdorferi* <sup>20</sup>. Estes agentes, através da produção de antigénios que mimetizam glicoproteínas e glicolípidos presentes na superfície das células do SNC, ativam linfócitos autorreativos que, através de anticorpos, podem promover uma inflamação a nível do SNC <sup>20</sup>.

Estudos efetuados demonstraram que o risco de desenvolver EM é muito superior (2-3 vezes) em indivíduos que tenham sofrido de MI do que nos que não tenham, sendo assim a base central para a evidência epidemiológica da associação entre o EBV e a EM. Os indivíduos EBV-seronegativos têm um risco de desenvolver EM 15 vezes mais reduzido que os seropositivos. Nos seropositivos, o vírus desencadeia uma resposta imune mediada pelas células Th1 (*T-helper 1*) e codifica proteínas que inibem a produção de citocinas antivirais (Interferão alfa (IFN- $\alpha$ ) e IFN- $\gamma$ ) e proteínas que interferem com a apresentação dos antigénios virais e outras que inibem a apoptose das células imunes infetadas <sup>21</sup>.

Uma meta-análise concluiu que o risco de desenvolver EM aparenta ser superior naqueles que desenvolveram MI em idades mais tardias aquando infetados pelo EBV

(incidência começa a aumentar na adolescência, atingindo um pico entre os 25 e os 30 anos), ser moderado para os pacientes infetados durante a infância e ser de aproximadamente zero para os que não foram infetados. Uma meta-análise recente demonstrou que o EBV está presente em 100% dos casos de EM, sugerindo que este vírus não é apenas fator de risco, mas também pré-requisito para a EM. Embora de forma controversa, se o que é proposto pela teoria da MI e da EM for correto, uma vacina contra o EBV poderia erradicar a EM. Há, concomitantemente, a sugestão de que um número reduzido, contudo substancial, de casos de EM, pode ser prevenido pela exposição das crianças ao EBV antes da adolescência <sup>9</sup>.

Realça-se também que, num estudo de caso-controlo de pessoas que desenvolveram EM, demonstrou-se que 100% dos pacientes EBV-seronegativos se tornaram seropositivos antes do início da EM e que apenas 36% das pessoas sem EM se tornaram EBV-seropositivos no mesmo período de tempo. Outro estudo demonstrou que o risco de desenvolver EM aumentava há medida que os títulos sorológicos do EBNA aumentavam. Um estudo de caso-controlo de pessoas que desenvolveram EM e que tinham amostras seriadas do soro revelou que o tempo aproximado entre a infecção primária por EBV e o início da esclerose múltipla foi de 2.3 a 9.4 anos (média de 5.6 anos) <sup>22</sup>. Um outro artigo reportou que o risco relativo de desenvolver EM para pessoas com histórico de MI é de 2.17 vezes mais e que aumenta em pessoas com determinados tipos de haplótipos MHC <sup>23</sup>.

Sabe-se que ser EBV-seronegativo é um fator de proteção para o desenvolvimento de EM e que uma infecção sintomática pelo vírus duplica a probabilidade de vir a desenvolver EM. O mecanismo pelo qual o vírus se apresenta como fator de risco para desenvolvimento da doença é divergente, sendo que historicamente se propõe a teoria do mimetismo molecular e, mais recentemente, a imortalização e/ou transformação dos linfócitos B induzida pelo EBV <sup>19</sup>.

Relativamente à patogenicidade do vírus, sabe-se que este infeta as células B do SNC, que por sua vez são descobertas nas placas de EM e que os efeitos citotóxicos produzidos nos tecidos cerebrais podem ser desencadeados por uma resposta imune aos antígenos líticos virais. No entanto, as placas corticais com maior atividade encontram-se maioritariamente rodeadas por linfócitos T CD8+, sugerindo que as lesões de progressão da EM não resultam das células B infetadas pelo EBV <sup>20</sup>. Teorias atuais sugerem que o método usado pelo EBV para se transladar da circulação periférica para o SNC pode passar por uma fuga das células B infetadas através da barreira hematoencefálica, criando uma inflamação local e ativação cruzada de anticorpos contra o vírus que se ligam aos antígenos da mielina, ou então através de uma desregulação do sistema imunitário devido à manipulação de

células B e monócitos, o que leva a uma autorreatividade das células T <sup>21</sup>. Foi proposto que o EBV possa residir nas células imunes e gliais do SNC e que as mesmas podem ser reconhecidas pela resposta celular B que, por sua vez, pode ser facilitada pela expressão de alelos de suscetibilidade à EM, do MHC. De outro modo, as lesões típicas da EM podem ser criadas quando as células B que saem do SNC são reconhecidas pelos linfócitos T CD8+ citotóxicos, a subcategoria maioritária de células T nas lesões da EM. A imortalização de células B infectadas pelo vírus EBV é facilitada pela expressão de EBNA1, EBNA2, LMP1 e LMP2, e especialmente a LMP1, que pode ser frequentemente encontrada no SNC de pessoas com EM. As células B de memória tornam-se um reservatório viral onde as adaptações e latência virais promovem uma fuga à vigilância imunológica realizada pelos linfócitos T citotóxicos e por anticorpos. Sendo que, tanto a LMP1 como a LMP2, são produzidas simultaneamente e se regulam uma à outra, a sua desregulação pode gerar uma expansão autorreativa das células B que se tornam independentes da coestimulação por linfócitos T. Este processo pode ser facilitado pelos alelos de suscetibilidade da EM que reduzem a expressão de CD40 (*Cluster* de diferenciação 40) o que, por sua vez, pode reduzir as condições necessárias para ativar o LMP1 e assim permitir ao indivíduo uma resposta mais rápida a infeções. No entanto, simultaneamente, pode promover o desenvolvimento de doenças autoimunes e neoplásicas <sup>24</sup>.

Há incongruências nos estudos realizados até à presente data relativamente à hipótese do EBV ser uma exigência para o desenvolvimento de EM. No entanto, há autores que sugerem que a utilização de aciclovir possa ter influência nos *outcomes* dos pacientes com EM e conjuntamente há autores que sugerem que uma vacinação contra o EBV em crianças com risco elevado de desenvolver EM devido a história familiar positiva, possa ser benéfico <sup>20</sup>. Um estudo realizado por *Wandinger et al.* verificou que existia uma associação entre a reativação do EBV e as recaídas da EM, contudo, o mesmo não se verificava com a progressão da doença <sup>20</sup>. Um estudo realizado por *Villoslada et al.* encontrou níveis elevados de IgG anti-EBNA em doentes em fases iniciais de EM verificando-se que à medida que a EM ia progredindo havia uma diminuição da prevalência dos anticorpos referidos, concluindo que a EM pode ser primariamente desencadeada por antigénios virais do EBV latente de indivíduos imunizados, mas que a progressão ou as alterações no padrão de EM secundária-progressiva não se encontravam relacionadas com o vírus <sup>20</sup>.

Coloca-se a hipótese de que, o aumento da prevalência e a associação do EBV à EM e outras doenças autoimunes, seja apenas uma consequência de uma ativação crónica das células B mas não um agente causador. Assim, o envolvimento deste vírus e a forma através da qual influencia a EM permanecem atualmente incertas até que se verifique uma resposta e diminuição da atividade da mesma a um tratamento de inibição viral <sup>24</sup>.

### **4.3. Neoplasias Associadas ao EBV**

Em relação às neoplasias associadas ao EBV, anualmente, a nível mundial, são reportados aproximadamente 200.000 novos casos, sendo as mais frequentes: linfoma de Burkitt (LB), linfoma de Hodgkin (LH), doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), linfoma extranodal de células NK-T (LENKT)- tipo nasal e carcinoma nasofaríngeo (CN) <sup>5</sup>.

#### **4.3.1. Linfoma de Burkitt (LB)**

O Linfoma de Burkitt (LB) compreende a maioria dos linfomas de células B da infância, mas apenas até 5% dos linfomas de células B na idade adulta. Trata-se de um linfoma não-Hodgkin de alto grau e, apesar de estar associado ao EBV, o vírus não é necessário como agente causal. Este linfoma origina-se a partir de centros germinativos ou pós-germinativos de células B <sup>25</sup>. Todos os tipos de LB possuem a translocação do gene regulador/proto-oncogene MYC (no cromossoma 8) justaposta ao gene da cadeia pesada (mais frequentemente), ou da cadeia leve da Ig, no cromossoma 14, e, quando uma célula B é infetada previamente à translocação, após a mesma, as células evitam a morte celular por apoptose entrando depois num crescimento descontrolado <sup>26 27 28</sup>.

Salientar a existência de 3 formas descritas: a endémica, a esporádica e a associada a imunodeficiência <sup>25</sup>. O LB endémico manifesta-se mais frequentemente em crianças sob a forma de um tumor da mandíbula, podendo apresentar-se igualmente no intestino, mama, ovário, e associando-se também, a manifestações com características leucémicas; o LB esporádico manifesta-se em idades mais tardias (30 anos), frequentemente com massas abdominais, linfadenopatia localizada, doença extranodal, envolvimento do SNC e envolvimento da MO; e o LB associado à imunodeficiência afeta principalmente os indivíduos VIH+ e os recetores de órgãos transplantados, manifestando-se de forma clinicamente agressiva, com mais sintomas B, maior incapacidade para as atividades de vida diária, doença em estadio avançado e envolvimento da MO <sup>25</sup>.

Sabe-se que o EBV conduz ao desenvolvimento de linhas celulares linfoblastóides alteradas através da ativação da proliferação de células B. Estas linhas celulares são responsáveis pela produção de proteínas virais de latência que, por sua vez, modulam as vias reguladoras da *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) e do NF-κB que, quando alteradas, se relacionam com uma desregulação do ciclo celular e neoplasias, nomeadamente o LB <sup>4 27 29</sup>.

O LB endémico encontra-se uniformemente associado com o EBV (aproximadamente 100% dos casos são EBV-seropositivos) e afeta principalmente crianças

entre os 4-7 anos (apesar de 50% das crianças ser infetada com o vírus ainda antes do 1 ano de vida), maioritariamente do sexo masculino, no este de África, envolvendo habitualmente a mandíbula e outros ossos do maciço facial. No entanto, também pode envolver outros locais extranodais <sup>8 22 27</sup>.

Torna-se interessante realçar que estudos realizados demonstraram que uma exposição das crianças em áreas com elevada incidência para o LB endémico a uma infeção por *Plasmodium falciparum* (as restantes formas do *plasmodium* ainda não foram implicadas na etiologia do LB associado ao EBV) tem vindo a ser associada a taxas de reativação do EBV mais elevadas, assim como mais episódios de virémia quando comparadas com crianças que não foram coinfetadas de forma repetida com a malária <sup>30</sup>. Estudos epidemiológicos concluem que, a existência de LB endémico, é restrita a regiões geográficas onde a malária por *Plasmodium falciparum* é endémica e também onde a infeção primária por EBV ocorre em idades mais precoces <sup>28</sup>.

A influência da malária no LB associado ao EBV tem como base dois mecanismos etiológicos possíveis: a) através da indução de défices na vigilância imunológica para com os antigénios virais e conseqüente incapacidade de reduzir o número de células B infetadas pelo vírus na sua forma latente durante episódios de reativação lítica; b) através da indução da ativação das células B que, por sua vez, leva a uma reativação lítica viral e a uma expressão anómala da *activation-induced cytidine deaminase* (AID) e por conseguinte um aumento do sucesso da oncogénese provocada pela translocação do MYC. Pensa-se que a associação do EBV com a infeção por malária possa então gerar um ambiente de instabilidade genética e de oncogénese e que a malária não atue como um imunossupressor, mas sim como um potente agente desencadeador da patogénese do LB endémico associado ao EBV <sup>30 31</sup>.

Relativamente ao LB esporádico, este é encontrado mundialmente mas ocorre maioritariamente em países ocidentais e apenas 10-12% dos casos são associados ao EBV. Tem maior incidência em crianças do sexo masculino, sendo que, anatomicamente, os locais mais afetados se encontram na região abdominal, apesar de ser possível diagnosticar-se noutras localizações nodais ou extranodais <sup>8</sup>.

Em pacientes com VIH, o LB encontra-se associado ao EBV em 40-50% dos casos, apresentando-se frequentemente de forma muito agressiva e ocorrendo habitualmente nas fases mais precoces da infeção ou em doentes com imunossupressão grave, com níveis de células T CD4+ <200/μL, sendo que, o mais habitual é apresentar-se em estadió avançado e com sintomas B <sup>8 26</sup>. O LB também pode ocorrer, raramente, como uma complicação

linfoproliferativa tardia após um transplante de órgãos <sup>8</sup>. Habitualmente há maior percentagem de envolvimento nodal do que no LB endêmico, apesar do envolvimento extranodal do trato gastrointestinal, medula óssea ou do SNC permanecer frequente <sup>26 32</sup>. O prognóstico relaciona-se com o grau de imunodeficiência de base e com a extensão e volume do tumor, revelando ser pior em situação de imunodepressão grave e condicionando o envolvimento da MO e do SNC <sup>26</sup>. Comparativamente aos casos de LB esporádico, este LB VIH+ demonstra uma variação superior ao nível do tamanho e forma celular <sup>26</sup>.

No que concerne ao tratamento do LB em indivíduos VIH+ ou com imunodeficiência primária, habitualmente realiza-se, para além do regime de quimioterapia, concomitantemente terapia antirretroviral <sup>25</sup>.

#### 4.3.2. Linfoma de Hodgkin (LH)

O Linfoma de Hodgkin (LH) decorre de uma expansão clonal de células B malignas. Habitualmente, ao diagnóstico, os pacientes apresentam-se num estadio avançado com frequente envolvimento da MO <sup>33</sup>. A “massa” clinicamente diagnosticada, aparenta ser maioritariamente constituída por células reativas e a parte maligna de células tumorais corresponde apenas a <1% do tecido ou nódulo maligno <sup>33</sup>.

Estudos realizados demonstraram que títulos aumentados de anticorpos contra o EBV (antes e no momento do diagnóstico do LH), a deteção por Hibridação *in situ* do DNA viral e a expressão de *Epstein-Barr encoding regions* (EBERs) [nas Células de Reed-Sternberg (CRS)] e a deteção de DNA clonal do EBV em 20-25% de tecidos do LH evidenciam o envolvimento do vírus na patogénese do LH e sugerem que a infeção viral do progenitor tumoral das CRS ocorreu previamente à expansão clonal <sup>34</sup>. A prevalência do EBV nas CRS varia de acordo com o subtipo histológico e com os fatores epidemiológicos. No entanto, é mais frequente encontrar a presença de EBV nos LH clássicos de celularidade mista e menos frequentemente nos de esclerose nodular. As proteínas EBNA1 (estimulando a replicação do genoma viral, transformação maligna pela infrarregulação de um gene supressor de tumor e atração de Linfócitos T reguladores), LMP1 (mimetizando o recetor CD40e levando à ativação da via do NF-κB que por sua vez mantém a proliferação celular e evita a apoptose) e LMP2A (mimetizando o recetor de célula B e permitindo que os precursores de células B que não possuam este recetor sobrevivam à apoptose) são expressas nas CRS infetadas pelo EBV. A LMP1 induz também a expressão do ligando da proteína de morte celular programada 1 (PD-L1) através das vias da Proteína de ativação 1 (AP-1) e da *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT). Conclui-se assim que, a infeção por EBV induz a expressão de PD-L1 nos linfócitos de modo a promover o estado de tolerância imunológica. É devido a este facto que se realizam

tratamentos com anticorpos anti-proteína de morte celular programada 1 (PD-1) (pembrolizumab ou nivolumab), terapêuticas consideradas seguras e efetivas em estudos de *follow-up* a longo termo para doentes com Linfoma de Hodgkin Clássico (LHc) recidivante e/ou refratário. Devido ao seu sucesso nesta vertente, estão a ser efetuados estudos para aplicar esta terapêutica em casos de LHc, assim como o uso de Bortezomib, um inibidor de proteassoma, de modo a inibir as vias de sinalização da NF-kB para o LHc recidivante e/ou refratário <sup>35 36 37</sup>.

Outro estudo demonstrou também que, o EBV se encontra associado ao LHc em aproximadamente 40% dos casos e a expressão de LMP1 no LHc é significativamente mais elevada na África e América do Sul. O LHc associado a EBV é mais frequente em crianças, no sexo masculino e apresenta-se habitualmente em estadios clinicamente avançados, e a sobrevida associada à doença é inferior em mulheres mais velhas e também em pacientes pediátricos, bem como em jovens adultos que apresentem estadios avançados da doença <sup>38</sup>.

Considera-se que o EBV é fator causal para o LH, pelo menos em algumas variáveis, particularmente nos países em desenvolvimento e nos subtipos de LH associados ao VIH. Demonstrou-se também que, em pacientes VIH+ que desenvolvem LH, o EBV é encontrado em praticamente 100% dos casos e frequentemente em pacientes com níveis intermédios de imunodeficiência não sendo, contudo, nesse contexto, considerada doença definidora de SIDA <sup>28 33 34</sup>.

Alguns estudos demonstraram que no paciente com VIH, quando ocorre uma infeção por EBV e há estimulação da expansão clonal, a depleção do sistema imune celular pode ter um efeito protetor. Verificou-se que, pacientes VIH+ sob terapia antirretroviral, não ficam protegidos relativamente ao desenvolvimento do LH e que, em pacientes controlados sob esta terapia e com contagens elevadas de células T CD4, este facto pode inclusive contribuir para a patogénese e risco de desenvolver LH. Os pacientes VIH+ com LH, aquando do diagnóstico apresentam-se habitualmente em estadios avançados da doença e já com envolvimento da MO <sup>33</sup>.

Outro estudo demonstrou que a MI se associa a taxas aumentadas de LH. Também em estudos recentes, se verificou que o tempo médio entre a ocorrência de MI e o desenvolvimento de LH associado ao EBV foi de 4 anos e que o risco relativo de desenvolver este linfoma era 4 vezes superior depois da manifestação de MI por EBV. O desenvolvimento de uma vacina que reduzisse a MI por EBV poderia reduzir o risco de desenvolvimento de LH <sup>22</sup>.

O LHC em crianças e em adultos jovens pensa-se ser consequência da infecção primária por EBV, enquanto que nos adultos pensa-se ser consequência, em parte, da senescência da imunidade ao EBV e do aumento dos níveis de EBV. O papel etiológico do EBV no LHC aparenta ser o de fornecer os sinais necessários para o crescimento e sobrevivência das alterações neoplásicas nas células progenitoras das CRS <sup>28</sup>.

#### 4.3.3. Doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT)

A doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT) consiste numa complicação da imunossupressão farmacológica realizada após transplante de órgãos sólidos ou transplante de células estaminais hematopoiéticas <sup>39 40</sup>. A receção de enxertos ricos em tecido linfoide, com células B infetadas com o EBV e o uso frequente de preparações de anticorpos contra linfócitos T, de modo a evitar a rejeição celular aguda ou como agentes pré-condicionadores, diminuem a resposta direta dos linfócitos T CD8+ contra o vírus <sup>41</sup>.

Habitualmente, esta doença é causada por uma infecção por EBV com consequente proliferação anormal de células B que, num paciente sob imunossupressão, se torna grave e pode causar desde hiperplasia linfoide com infiltrados clonais por infecção por EBV até linfomas. Nos pacientes pediátricos com DLPT, os sintomas envolvem a cabeça e pescoço 25-63% das vezes. A DLPT ocorre habitualmente nos primeiros dois anos após realização do transplante, provavelmente devido à elevada intensidade da imunossupressão. No entanto, pode vir a ser diagnosticada após várias décadas da transplantação e em qualquer estadio <sup>39 42</sup>. É relevante salientar que os pacientes EBV-seronegativos, antes da realização do transplante, são aqueles com maior risco de desenvolver DLPT quando recebem um órgão de um dador EBV-seropositivo <sup>43</sup>.

Casos de DLPT podem ser divididos em dois tipos principais: doença de início precoce (monoclonal ou policlonal) relacionada com o EBV, que pode responder a uma redução por imunossupressão, ou doença de início mais tardio que é habitualmente um linfoma EBV-seronegativo e que requer quimioterapia agressiva e apresenta fracos resultados <sup>43</sup>.

Deve suspeitar-se de DLPT em pacientes com elevadas cargas virais de EBV e achados focais ao exame objetivo, ou num paciente assintomático com uma infecção primária por EBV e um aumento da carga viral <sup>41</sup>. Aproximadamente 90% dos casos de DLPT originam-se de células B e 80% associam-se ao EBV. Os sintomas são frequentemente inespecíficos e moderados tais como, febre, sintomas mononucleose-*like*, linfadenopatia e infecções recorrentes. Esta doença tende a ocorrer em locais extranodais tais como o fígado, o trato gastrointestinal, o rim e o SNC, apesar de também ser habitual haver múltiplo

envolvimento nodal. A DLPT é frequentemente associada a doentes com transplante de pulmão (6-10%), de coração (3-5%), de fígado (2-3%) e de rim (1.5-2.5%) e a prevalência relacionada com a duração e intensidade da imunossupressão utilizada <sup>42 43</sup>.

Pacientes com VIH/SIDA com imunodeficiência grave e alta carga viral de EBV, desenvolvem, habitualmente, linfomas associados ao vírus EBV pela falta de células importantes no controlo da infeção por EBV. Assim, verificaram-se melhores resultados com a aplicação da terapia de transferência celular adotiva de células T para patologia linfoproliferativa pós-transplante provocada pelo EBV, quando os linfócitos T CD4+ específicos do EBV são transferidos para o paciente juntamente com linfócitos T CD8+ <sup>34</sup>.

A primeira linha de tratamento para a DLPT passa pela restauração dos níveis de células T através da redução da imunossupressão. Igualmente, o uso de imunoglobulinas intravenosas pode auxiliar passivamente na reposição da imunidade anti-EBV <sup>44</sup>. O uso de aciclovir, ganciclovir ou cidofovir pode revelar-se útil, no entanto, a sua eficácia ainda não foi demonstrada em ensaios clínicos comparativos e prospetivos <sup>41</sup>.

O controlo dos níveis de EBV pode ser realizado através do teste de PCR o que ajuda no diagnóstico de DLPT. Contagens absolutas de células T CD4+ significativamente baixas na DLPT associam-se a cargas virais elevadas. Níveis elevados das Interleucina 6 (IL-6) e IL-10 observaram-se em doentes com DLPT após transplante hepático <sup>41</sup>.

Conclui-se que a incompatibilidade relacionada com o EBV (Dador+/Recetor-) contribui para o risco de desenvolver DLPT <sup>43</sup>.

#### 4.3.4. Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB)

Anteriormente denominado de linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) do idoso, o LDGCB associado ao EBV, reconhecido em 2016 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorre maioritariamente em indivíduos imunossuprimidos, com idade superior a 50 anos e apresenta-se clinicamente agressivo e com um prognóstico pior que o LDGCB EBV-seronegativo para a mesma faixa etária <sup>45 46</sup>. Contudo, também pode ser observado em pacientes mais novos e/ou imunocompetentes, apesar do seu aparecimento ser mais frequentemente relacionado com a senescência relacionada com a idade <sup>47 48</sup>.

Há uma predominância deste linfoma na população asiática (quando comparada com as populações ocidentais) e em pacientes com processos inflamatórios crónicos. O LDCCB EBV-seropositivo apresenta-se em locais extranodais em 70% dos pacientes, embora haja frequentemente envolvimento simultâneo dos nódulos linfáticos <sup>45 46</sup>.

Vários estudos concluíram que, ser seropositivo para o EBV, é um fator prognóstico adverso. Recentemente, demonstraram que é mais difícil atingir a remissão completa após quimioterapia quando se é EBV-seronegativo e, nesse contexto, verificou-se uma sobrevida inferior dos EBV-seropositivos. Contudo os *outcomes* costumam ser ligeiramente melhores quando os pacientes são tratados com quimioimunoterapia <sup>46 47</sup>. A imunoterapia celular utilizada até ao momento, consiste no uso de linfócitos citotóxicos autólogos direcionados a antígenos LMP e serve como tratamento coadjuvante após quimioterapia, de modo a prevenir recidivas, ou como tratamento de salvação na doença refratária/recidivante <sup>49</sup>.

Vários fármacos foram testados e, nesse contexto, as terapias antivirais (como o ganciclovir e o aciclovir), para induzirem atividade antiviral, necessitam de proteínas de fase lítica. Contudo, o vírus mantém-se em fase latente nas células B infetadas, tornando-se importante induzir a fase lítica para poder levar a uma exposição efetiva ao tratamento antiviral e ao sucesso terapêutico. Nessa sequência, torna-se necessário recorrer a indutores da fase lítica que são inibidores da metil-transferase, inibidores da histona desacetilase e inibidores dos proteassomas <sup>47</sup>.

Estudos em desenvolvimento revelam que a imunoterapia aparenta oferecer uma alternativa eficaz para pacientes com linfomas associados ao EBV, incluindo o LDGCB, bem como a utilização de Células T CAR (recetor de antígeno quimérico), células modificadas contra marcadores associados ao tumor que se encontra em desenvolvimento. Atualmente, já existe evidência científica da eficácia da terapia com Células T CAR direcionadas ao LMP1 como terapêutica no CN <sup>47</sup>.

#### 4.3.5. Linfoma Extranodal de células NK-T (LENKT)- tipo nasal

O linfoma extranodal de células NK-T (LENKT) é um tumor mais frequentemente observado na cabeça e no pescoço, primariamente na cavidade nasal e é predominantemente um linfoma extranodal da linhagem de células T ou células NK. Este tipo de tumor é caracterizado pela infeção por EBV, necrose proeminente, imunofenótipo citotóxico e angioinvasão. O LENKT envolve mais frequentemente a cavidade nasal e/ou os seios perinasais. Sempre que se verificar um envolvimento da nasofaringe e da cavidade oral (palato) deve excluir-se uma extensão de um tumor primário da cavidade nasal. O LENKT também pode ser observado em localizações extra-nasais e que não sejam na cabeça ou pescoço, tais como, a pele, tecidos moles, trato gastrointestinal e testículos e, pode envolver, secundariamente, os nódulos linfáticos, ou de forma menos habitual, o tecido muscular ou o útero. O envolvimento de nódulos linfáticos regionais é relativamente comum mas ocorre habitualmente numa fase mais tardia. Também se verificou que este tumor ocorre mais frequentemente em locais onde ocorreu, previamente, infeção primária por EBV <sup>8 48 50 51</sup>.

É frequente o LENKT apresentar-se em estádios avançados, com envolvimento extranodal. Os sintomas sistêmicos consistem em mal-estar geral, perda de peso e febre e em raros casos pode surgir síndrome hemofagocítica. Contudo, indivíduos com LENKT em idades mais precoces, apresentam mais frequentemente sintomas B, estádios mais avançados e maior envolvimento extranodal <sup>45 48 50</sup>.

Verificou-se que, este tumor é mais frequente em pacientes com quadros de imunossupressão, incluindo os doentes submetidos a transplante de órgãos, assim como em indivíduos originários da Ásia e Nativos da América Central e da América do Sul, concluindo-se assim que há uma predisposição racial para desenvolver LENKT. Este tende a ser uma doença da idade adulta, com uma idade média de aparecimento entre os 44-54 anos, sendo de maior prevalência no sexo masculino (apesar de também poder surgir em idades mais precoces como a adolescência, o que resulta na colocação da hipótese da existência de diferentes processos de etiologia do linfoma em causa). A maioria dos pacientes falece após em média 4.2 anos, aparentando ser a presença ou ausência de doença a nível nasal, o fator de prognóstico mais relevante <sup>8 16 45 50</sup>. Sabe-se que, pacientes com LENKT e que se apresentam com patologia cutânea primária são os que possuem pior prognóstico <sup>45</sup>.

A apresentação mais frequente consiste numa lesão ocupante de espaço, levando a quadros obstrutivos e de epistaxis ou uma lesão destrutiva na linha média facial frequentemente associada a perfuração do septo nasal, perfuração do palato e/ou edema orbital <sup>8 50</sup>. Este linfoma é caracterizado por uma necrose proeminente, um fenótipo citotóxico e uma associação com o EBV. A linhagem celular pode ser maioritariamente de células NK ou de linfócitos T citotóxicos <sup>50</sup>.

O tratamento mais habitual consiste em quimioterapia com ou sem radioterapia, sendo que esta última é adicionada no caso de pacientes com patologia localizada. Decorrem investigações que sugerem que a terapia com imatinib pode ser útil, futuramente, devido ao perfil génico de sobreexpressão do fator de crescimento alfa derivado de plaquetas (PDGF-alfa). O tratamento com radiação e quimioterapia em simultâneo ou então tratamentos tal como o SMILE (esteroides, metotrexato, ifosfamida, L-asparaginase e etoposido) melhoram o prognóstico, anteriormente muito reservado (sobrevivência média de 30-40%), desta patologia <sup>8 50 45 52</sup>.

Outro aspeto de suma importância reside no diagnóstico diferencial com a granulomatose de Wegener e com uma infeção por herpes simples, devido à partilha de algumas semelhanças <sup>50</sup>.

Conclui-se haver necessidade de incorporar elementos tais como, tomografia por emissão de positrões em conjunto com uma tomografia computadorizada (PET-TC) e avaliação do DNA do EBV plasmático em futuros modelos prognósticos, de modo a prever *outcomes* e adaptar uma terapêutica adequada tomando em consideração os fatores de risco que possam existir. É importante investir na realização de ensaios clínicos para testar terapias imunológicas baseadas no estímulo da atividade antiviral mediada pelas células T devido à infecção por EBV das células linfomatosas <sup>51</sup>.

#### 4.3.6. Carcinoma Nasofaríngeo (CN)

A prevalência do CN associado ao EBV (mais de 97% dos Carcinomas Nasofaríngeos são EBV-seropositivos), alerta para a importância do controle que deve haver perante células epiteliais infetadas pelo vírus nos locais de ocorrência desta neoplasia <sup>11 53 54</sup>. Sabe-se que o vírus permanece dentro das células epiteliais em fase latente devido à fusão de terminais de fragmentos do seu genoma em plasmídeos e que, estudos realizados, detetaram fragmentos fusionados com tamanhos similares em diferentes amostras de biópsias de CN, sugerindo uma possível etiologia de expansão clonal a partir de uma única célula EBV-positiva. Estudos recentes, que exploram a base molecular do CN, encontraram alterações genéticas cruciais para o desenvolvimento e progressão da doença. Contudo, atualmente a base molecular da patogênese do EBV no epitélio nasofaríngeo ainda não é considerada exata <sup>53 55</sup>. O CN é um carcinoma com uma elevada infiltração linfocitária de linfócitos não-malignos e considera-se que o EBV é uma componente necessária à patogênese do mesmo, contudo, insuficiente, necessitando de alterações cromossômicas pré-neoplásicas adicionais que posteriormente se iram combinar com o microambiente imune <sup>55 56</sup>.

É de salientar que o estadió da neoplasia é um importante fator de prognóstico com impacto a nível da sobrevivência e dos *outcomes*. Trata-se de um carcinoma com elevada prevalência no continente asiático (sobretudo na China) e moderada no continente Africano, rara incidência na América do Norte, Europa, América Latina e Oceânia e uma prevalência 3 vezes superior na população masculina, quando comparada com a feminina. Investigações realizadas, que analisaram os polimorfismos do genoma do EBV em diferentes cancros em que os pacientes revelaram ser EBV-seropositivos, agruparam o EBV de origem asiática separadamente das restantes regiões geográficas, colocando a hipótese de que, alterações mínimas em nucleótidos do genoma viral, possam ser um fator de risco para a prevalência mais elevada de CN na população verificada nesta região <sup>50 53 57</sup>.

Os sintomas precoces do CN são inespecíficos e podem incluir cefaleias, algia facial neuropática, massa cervical, epistaxis e obstrução nasal, o que pode culminar em

diagnósticos incorretos, atrasos terapêuticos e *outcomes* pobres devido à consequente realização do diagnóstico em fases tardias da doença. O protocolo *standard* no caso de uma suspeita de CN em populações de risco consiste numa avaliação endoscópica completa do trato aerodigestivo superior. A maioria dos casos de CN é diagnosticado já em fases avançadas da doença, quando os doentes apresentam massas cervicais <sup>53</sup>.

No que concerne ao diagnóstico, as biópsias das lesões e a avaliação histopatológica são fundamentais. Os anticorpos IgA anti-EA e anti-VCA e os IgA anti-EBNA1 são frequentemente utilizados para detetar casos de CN em áreas onde a doença é endémica. No entanto, a sua baixa sensibilidade e especificidade impede o seu uso para rastreio de CN em populações assintomáticas. A deteção do DNA do EBV, como um teste de rastreio populacional, afigura-se uma promissora abordagem futura para detetar casos de CN em estadios precoces, já que os estudos feitos até à data demonstram uma elevada sensibilidade e especificidade deste teste serológico <sup>53 55 58</sup>. A combinação do resultado obtido na PET com o radioisótopo FDG-Flúor 18 e dos níveis de DNA do EBV no plasma através do teste da PCR, pode ser uma melhor estratégia de estratificação dos pacientes com CN em diferentes subgrupos, mais precisos do que os obtidos através do sistema de estadiamento convencional TNM (avalia o Tumor, Nódulos Linfáticos e Metástases) <sup>55</sup>.

Considera-se importante destacar que o prognóstico se torna mais reservado se ao momento do diagnóstico de CN forem encontradas metástases ganglionares cervicais ou retrofaríngeas, já que, nestes casos, o risco de micro-metástases à distância é superior e a quimo-radioterapia concomitante pode vir a ser necessária <sup>53</sup>. Contudo, recentemente, demonstrou-se que a utilização de um diagrama que combine o DNA plasmático do EBV pré-tratamento e as possíveis formas de apresentação clinico-patológicas resulta numa predição mais precisa a nível do prognóstico para estes pacientes. Demonstrou-se que, uma resposta desfavorável da quantidade plasmática de DNA do EBV após a quimioterapia de indução, a meio do percurso radioterapêutico ou após o tratamento, é um indicador de prognóstico adverso nos *outcomes* clínicos. Também, um ensaio clínico prospetivo multicêntrico, confirmou que os níveis plasmáticos de DNA viral estão correlacionados com o risco de falência locorregional, metástases à distância e morte por CN <sup>55 59</sup>.

## 5. Conclusões

Trata-se de um vírus que possui, do ponto de vista etiopatológico, transversalidade para várias patologias com perfil oncológico, cuja eventual prevenção tem como base uma melhor compreensão sobre a etiopatogenia viral, bem como a sua correlação com a evolução do ponto de vista das patologias a ele associadas.

O vírus Epstein-Barr possui um mecanismo maioritário de transmissão (através da saliva) ideal para promover a sua propagação. A patologia primária benigna e autolimitada mais frequentemente causada pelo vírus é a MI, com uma comprovada distribuição mundial, é maioritariamente observada na adolescência e em jovens adultos de países desenvolvidos.

A nível mundial tem-se verificado que, aproximadamente 90% dos adultos saudáveis são portadores do vírus, tornando-se então relevante a análise da distribuição populacional e incidência global das patologias a ele maioritariamente associadas, de modo a melhor compreender os principais mecanismos base de cada uma delas e por forma a ser possível atuar a nível profilático e/ou terapêutico nas mesmas.

As células infetadas pelo vírus, os antígenos e proteínas por ele produzidos [de acordo com a respetiva fase em que o mesmo se encontra (fase lítica ou fase de latência, com os respetivos padrões de latência)], a sua atuação sob determinados mecanismos e vias celulares (de realçar a via NF-kB) e os mecanismos de ação imunitária por ele manipulados, constituem a base da investigação que decorre na atualidade de modo a poder intervir na prevenção e no tratamento das várias patologias que estabelecem relação etiopatogénica com o EBV.

Verifica-se que o EBV possui um potencial superior para desenvolver patologia maligna associada a situações de imunodeficiência. Estas ocorrem tanto em indivíduos que sejam sujeitos a imunossupressão provocada [como no caso da Doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT) e do Linfoma de Burkitt que, podem desenvolver-se em doentes submetidos a transplante de órgãos e imunossupressão medicamentosa, promovendo a infeção e expansão do EBV] mas também no caso de indivíduos cuja imunodeficiência consiste em serem VIH+, ficando estes sujeitos a maior risco de desenvolver patologia maligna associada ao EBV, tais como o Linfoma de Burkitt, Linfoma de Hodgkin e também a DLPT.

É de salientar que a interação do vírus com outras alterações provocadas por diferentes agentes patogénicos também se verifica. Exemplo disso é o caso do Linfoma de Burkitt endémico, cuja incidência se verificou superior em áreas geográficas onde a malária por

*Plasmodium falciparum* também é endêmica (provocando coinfeções sucessivas com malária).

Apesar do considerável aumento na quantidade e qualidade dos estudos efetuados relativamente ao vírus e à sua associação e mecanismos de relação com as malignidades referidas ao longo da presente dissertação, verifica-se que a temática das malignidades associadas ao vírus Epstein-Barr carece, ainda, de maior aprofundamento e investimento em estudos mais alargados e significativos, já que, ainda existe uma deficiente estratégia de reconhecimento e diagnóstico no que diz respeito às neoplasias e doenças autoimunes associadas ao EBV, assim como no que diz respeito à prevenção e terapêutica das mesmas com base nos mecanismos de atuação viral e consequente transformação celular neoplásica.

Devido ao facto de a infeção primária por EBV constituir um fator de risco na etiopatogenia da Esclerose Múltipla e das malignidades referidas ao longo da presente dissertação, devem ser constituídos e implementados planos de acompanhamento e vigilância da população residente em zonas endémicas, perspetivando o aparecimento das malignidades [linfoma de Burkitt (LB), linfoma de Hodgkin (LH), doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT), linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), linfoma extranodal de células NK-T (LENKT)- tipo nasal e carcinoma nasofaríngeo (CN)], assim como um acompanhamento transversal e horizontal para todos os doentes que desenvolveram MI aquando da infeção primária por EBV. Esta necessidade surge com o intuito de detetar e prevenir possíveis alterações neoplásicas decorrentes dos mecanismos de interação entre o vírus e o organismo. Desta forma, deparamo-nos com a imprescindibilidade de conceber abordagens laboratoriais mais cuidadas e rigorosas e com a necessidade de emitir *Guidelines* válidas para confirmação diagnóstica, com precisão e qualidade elevadas, transversais a nível mundial.

No que concerne à vacinação, vários estudos e ensaios clínicos sugerem que a vacina contra o EBV oferece a possibilidade de conferir proteção contra a MI e reduzir a frequência das neoplasias associadas ao vírus, sem que, no entanto, os indivíduos alcancem uma imunidade esterilizante. Outros estudos verificaram que a vacina de adultos baseada na glicoproteína viral gp350 não preveniu a infeção pelo EBV, contudo a sua implementação levou a uma redução da sintomatologia de MI. Também vários autores sugerem que vacinar crianças com elevado risco de desenvolver EM (devido história familiar) contra o EBV tenha benefícios. Conclui-se ser de fundamental importância realizar um investimento na área do desenvolvimento de uma vacina, eficaz e segura, contra o EBV, idealmente capaz de reduzir a sintomatologia da MI assim como das possíveis consequências malignas a longo prazo associadas.

A imunoterapia para linfomas associados ao EBV e para o CN, representa uma área promissora e alvo de um futuro investimento, assim como o desenvolvimento de terapias direcionadas que tiram partido da ativação de células T, assim como de inibidores de *checkpoints* celulares que, por sua vez, constituem estratégias que oferecem menor toxicidade e maior qualidade de vida aos doentes com estas neoplasias, quando comparadas com algumas das estratégias terapêuticas de quimioterapia e radioterapia usadas até então.

É de salientar a importância e a necessidade de desenvolver mais estudos no que diz respeito à forma como os níveis plasmáticos de DNA viral podem vir a ser utilizados na estratificação da resposta individual ao tratamento de todas estas neoplasias assim como o interesse em avaliar se existe a possibilidade de converter este parâmetro num biomarcador a nível do rastreio, diagnóstico, vigilância e tratamento.

## 6. Bibliografia

1. Münz, C. Epstein Barr virus — a tumor virus that needs cytotoxic lymphocytes to persist asymptotically. *Curr. Opin. Virol.* **20**, 34–39 (2016).
2. Kasper, D. L. Epstein-Barr Virus Infections, Including Infectious Mononucleosis. in *Harrison's principles of internal medicine* (ed. Jeffrey I, C.) 1358–1361 (New York : McGraw Hill Education Medical, 2018).
3. Smatti, M. K. *et al.* Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front. Oncol.* **8**, 211 (2018).
4. Sangueza-Acosta, M. & Sandoval-Romero, E. Epstein-Barr virus and skin. *An. Bras. Dermatol.* **93**, 786–799 (2018).
5. Dasari, V., Bhatt, K. H., Smith, C. & Khanna, R. Designing an effective vaccine to prevent Epstein-Barr virus-associated diseases: challenges and opportunities. *Expert Rev. Vaccines* **16**, 377–390 (2017).
6. Dunmire, S. K., Hogquist, K. A. & Balfour, H. H. Infectious Mononucleosis. in *Epstein Barr Virus Volume 1* (ed. Münz, C.) vol. 390 211–240 (Springer International Publishing, 2015).
7. Okano, M. Recent Concise Viewpoints of Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. *Curr. Pediatr. Rev.* **11**, 5–9 (2015).
8. Auerbach, A. & Aguilera, N. S. Epstein–Barr virus (EBV)-associated lymphoid lesions of the head and neck. *Semin. Diagn. Pathol.* **32**, 12–22 (2015).
9. Lennon, P., Crotty, M. & Fenton, J. E. Infectious mononucleosis. *BMJ* **350**, h1825–h1825 (2015).
10. Jiang, S.-Y. *et al.* Real-time polymerase chain reaction for diagnosing infectious mononucleosis in pediatric patients: A systematic review and meta-analysis: RT-PCR for Diagnosing Infectious Mononucleosis in Pediatric Patients. *J. Med. Virol.* **88**, 871–876 (2016).
11. Dunmire, S. K., Verghese, P. S. & Balfour, H. H. Primary Epstein-Barr virus infection. *J. Clin. Virol.* **102**, 84–92 (2018).
12. Hislop, A. D. Early virological and immunological events in Epstein–Barr virus infection. *Curr. Opin. Virol.* **15**, 75–79 (2015).
13. Tangye, S. G., Palendira, U. & Edwards, E. S. J. Human immunity against EBV—lessons from the clinic. *J. Exp. Med.* **214**, 269–283 (2017).

14. De Paor, M., O'Brien, K., Fahey, T. & Smith, S. M. Antiviral agents for infectious mononucleosis (glandular fever). *Cochrane Database Syst. Rev.* (2016) doi:10.1002/14651858.CD011487.pub2.
15. Sawada, A., Inoue, M. & Kawa, K. How we treat chronic active Epstein–Barr virus infection. *Int. J. Hematol.* **105**, 406–418 (2017).
16. Kimura, H. EBV in T-/NK-Cell Tumorigenesis. in *Human Herpesviruses* (eds. Kawaguchi, Y., Mori, Y. & Kimura, H.) vol. 1045 459–475 (Springer Singapore, 2018).
17. Wass, M. *et al.* Chronic active Epstein-Barr virus infection of T-cell type, systemic form in an African migrant: case report and review of the literature on diagnostics standards and therapeutic options. *BMC Cancer* **18**, 941 (2018).
18. Ascherio, A. & Munger, K. L. EBV and Autoimmunity. in *Epstein Barr Virus Volume 1* (ed. Münz, C.) vol. 390 365–385 (Springer International Publishing, 2015).
19. Dobson, R. & Giovannoni, G. Multiple sclerosis - a review. *Eur. J. Neurol.* **26**, 27–40 (2019).
20. Saberi, A., Akhondzadeh, S. & Kazemi, S. Infectious agents and different course of multiple sclerosis: a systematic review. *Acta Neurol. Belg.* **118**, 361–377 (2018).
21. Tarlinton, R. *et al.* The Interaction between Viral and Environmental Risk Factors in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 303 (2019).
22. Cohen, J. I. Vaccine Development for Epstein-Barr Virus. in *Human Herpesviruses* (eds. Kawaguchi, Y., Mori, Y. & Kimura, H.) vol. 1045 477–493 (Springer Singapore, 2018).
23. Dolei, A. The aliens inside us: HERV-W endogenous retroviruses and multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **24**, 42–47 (2018).
24. Baker, D., Pryce, G., Amor, S., Giovannoni, G. & Schmierer, K. Learning from other autoimmunities to understand targeting of B cells to control multiple sclerosis. *Brain* **141**, 2834–2847 (2018).
25. Casulo, C. & Friedberg, J. W. Burkitt lymphoma- a rare but challenging lymphoma. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **31**, 279–284 (2018).
26. Linke-Serinsöz, E., Fend, F. & Quintanilla-Martinez, L. Human immunodeficiency virus (HIV) and Epstein-Barr virus (EBV) related lymphomas, pathology view point. *Semin. Diagn. Pathol.* **34**, 352–363 (2017).
27. Kanda, T. EBV-Encoded Latent Genes. in *Human Herpesviruses* (eds. Kawaguchi, Y., Mori, Y. & Kimura, H.) vol. 1045 377–394 (Springer Singapore, 2018).

28. Shannon-Lowe, C., Rickinson, A. B. & Bell, A. I. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **372**, 20160271 (2017).
29. Bolis, V., Karadedos, C., Chiotis, I., Chaliasos, N. & Tsabouri, S. Atypical manifestations of Epstein–Barr virus in children: a diagnostic challenge. *J. Pediatr. (Rio J.)* **92**, 113–121 (2016).
30. Moormann, A. M. & Bailey, J. A. Malaria — how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis. *Curr. Opin. Virol.* **20**, 78–84 (2016).
31. Rochford, R. & Moormann, A. M. Burkitt’s Lymphoma. in *Epstein Barr Virus Volume 1* (ed. Münz, C.) vol. 390 267–285 (Springer International Publishing, 2015).
32. Low, L. K. & Song, J. Y. B-cell Lymphoproliferative Disorders Associated with Primary and Acquired Immunodeficiency. *Surg. Pathol. Clin.* **9**, 55–77 (2016).
33. Grewal, R. *et al.* Hodgkin’s lymphoma and its association with EBV and HIV infection. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **55**, 102–114 (2018).
34. Murray, P. & Bell, A. Contribution of the Epstein-Barr Virus to the Pathogenesis of Hodgkin Lymphoma. in *Epstein Barr Virus Volume 1* (ed. Münz, C.) vol. 390 287–313 (Springer International Publishing, 2015).
35. Matsuki, E. & Younes, A. Lymphomagenesis in Hodgkin lymphoma. *Semin. Cancer Biol.* **34**, 14–21 (2015).
36. Goodman, A., Patel, S. P. & Kurzrock, R. PD-1–PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 203–220 (2017).
37. Wang, H.-W., Balakrishna, J. P., Pittaluga, S. & Jaffe, E. S. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. *Br. J. Haematol.* **184**, 45–59 (2019).
38. Knecht, H. & Mai, S. LMP1 and Dynamic Progressive Telomere Dysfunction: A Major Culprit in EBV-Associated Hodgkin’s Lymphoma. *Viruses* **9**, 164 (2017).
39. O’Neill, A. F. *et al.* Post-transplant lymphoproliferative disorder of the pediatric airway: Presentation and management. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **86**, 218–223 (2016).
40. Kasahara, H. *et al.* Post-transplant lymphoproliferative disorder of the adrenal gland after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: report of two cases and literature review. *Transpl. Infect. Dis.* **17**, 909–914 (2015).
41. Lauro, A., Arpinati, M. & Pinna, A. D. Managing the challenge of PTLTD in liver and bowel transplant recipients. *Br. J. Haematol.* **169**, 157–172 (2015).

42. Habibeh, O., Elsayad, K., Kriz, J., Haverkamp, U. & Eich, H. T. Post-transplant lymphoproliferative disorder in the pelvis successfully treated with consolidative radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* **193**, 80–85 (2017).
43. Hirama, T., Tikkanen, J., Pal, P., Cleary, S. & Binnie, M. Epstein-Barr virus-associated smooth muscle tumors after lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* **21**, e13068 (2019).
44. Stanley, K. *et al.* Post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric intestinal transplant recipients: A literature review. *Pediatr. Transplant.* **22**, e13211 (2018).
45. Goodlad, J. R. Epstein-Barr Virus–associated Lymphoproliferative Disorders in the Skin. *Surg. Pathol. Clin.* **10**, 429–453 (2017).
46. Castillo, J. J. *et al.* EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* **93**, 953–962 (2018).
47. Castillo, J. J. *et al.* EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management: EBV+ DLBCL 2016 update. *Am. J. Hematol.* **91**, 529–537 (2016).
48. Haverkos, B. M. *et al.* Emerging Insights on the Pathogenesis and Treatment of Extranodal NK/T Cell Lymphomas (ENKTL). *17* (2017).
49. Battle-Lopez, A. *et al.* Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: diagnosis, difficulties and therapeutic options. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **16**, 411–421 (2016).
50. Chan, J. K. Virus-associated neoplasms of the nasopharynx and sinonasal tract: diagnostic problems. *Mod. Pathol.* **30**, S68–S83 (2017).
51. Tse, E. & Kwong, Y.-L. Diagnosis and management of extranodal NK/T cell lymphoma nasal type. *Expert Rev. Hematol.* **9**, 861–871 (2016).
52. Yamaguchi, M., Suzuki, R. & Oguchi, M. Advances in the treatment of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood* **131**, 2528–2540 (2018).
53. Lee, H. M., Okuda, K. S., González, F. E. & Patel, V. Current Perspectives on Nasopharyngeal Carcinoma. in *Human Cell Transformation* (eds. Rhim, J. S., Dritschilo, A. & Kremer, R.) vol. 1164 11–34 (Springer International Publishing, 2019).
54. Kanda, T., Yajima, M. & Ikuta, K. Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci.* **110**, 1132–1139 (2019).
55. Chen, Y.-P. *et al.* Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet* **394**, 64–80 (2019).

56. Holmes, B. J. & Wenig, B. M. Virus-associated carcinomas of the head & neck: Update from the 2017 WHO classification. *Ann. Diagn. Pathol.* **38**, 29–42 (2019).
57. Dourthe, M.-E. *et al.* Childhood Nasopharyngeal Carcinoma: State-of-the-Art, and Questions for the Future. *J Pediatr Hematol Oncol* **00**, 8 (2017).
58. Choi, S. J., Jung, S. W., Huh, S., Cho, H. & Kang, H. Phylogenetic comparison of Epstein-Barr virus genomes. *J. Microbiol.* **56**, 525–533 (2018).
59. Lam, W. K. J. & Chan, J. Y. K. Recent advances in the management of nasopharyngeal carcinoma. *F1000Research* **7**, 1829 (2018).