



JACQUELINE FÁTIMA MARTINS DE ALMEIDA MORAES

**IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE HSV-2, EBV, CMV E HHV-8
EM PACIENTES COM NÓDULOS TIREOIDIANOS**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

JACQUELINE FÁTIMA MARTINS DE ALMEIDA MORAES

**IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE HSV-2, EBV, CMV E HHV-8
EM PACIENTES COM NÓDULOS TIREOIDIANOS**

Orientação: Prof^a Dr^a Laura Sterian Ward

Coorientação: Prof^o Dr. Alfio Jose Tincani

Dissertação de Mestrado apresentada a Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de mestra em Ciências, área de concentração em Clínica Médica. Sob orientação da Prof^a Dr^a Laura Sterian Ward e Coorientação do Prof^o Dr. Alfio Jose Tincani.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR JACQUELINE FÁTIMA MARTINS DE ALMEIDA MORAES, E ORIENTADA PELA PROF^a. DR^a. LAURA STERIAN WARD.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS,
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

AL64i Almeida, Jacqueline Fátima Martins, 1989-
Identificação da presença do HSV-2, CMV, EBV e HHV-8
em pacientes com nódulos tireoidianos / Jacqueline Fátima
Martins de Almeida Moraes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Laura Sterian Ward.
Coorientador : Alfio José Tincani.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Herpesvirus. 3.
Citomegalovirus. 4. Infecções por vírus Epstein-Barr. 5. Carga
viral. I. Ward, Laura Sterian, 1956-. II. Tincani, Alfio José, 1954-.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Identification of the presence of HSV-2, CMV, EBV and HHV-8
in thyroid nodules patients

Palavras-chave em inglês:

Thyroid neoplasms

Herpesvirus

Cytomegalovirus

Infection by Epstein-Barr virus

Viral load

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Laura Sterian Ward [Orientador]

Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Rita de Cássia Ferreira

Data de defesa: 09-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

JACQUELINE FÁTIMA MARTINS DE ALMEIDA MORAES

ORIENTADORA: PROF. DR. LAURA STERIAN WARD

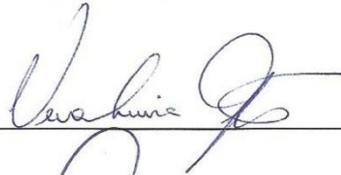
COORIENTADOR: PROF. DR. ALFIO JOSE TINCANI

MEMBROS:

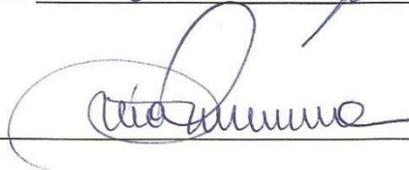
1. PROF. DR. LAURA STERIAN WARD



2. PROF. DR. VERA LUCIA GIL DA SILVA LOPES



3. PROF. DR. RITA DE CÁSSIA FERREIRA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09 de abril de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais: Carlos e

Beth, que sempre me apoiaram e

fizeram de mim a pessoa que sou hoje.

Ao meu irmão Carlos Henrique, meu caçula

que tanto amo.

E ao meu marido, Luiz Filipe, que sempre esteve ao

meu lado não importa o que acontecesse, na

alegria e na tristeza. Obrigada por sempre me

incentivar e colaborar em muitos sentidos para

a realização deste trabalho, eu não teria

conseguido sozinha.

Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Creio que para tudo há um propósito debaixo dos céus, o Senhor me deu essa oportunidade e me deu forças para continuar, tudo parece mais fácil Contigo ao meu lado.

Agradeço também, antes de qualquer pessoa, à minha orientadora Prof^a Dra. Laura Sterian Ward, obrigada primeiramente pela oportunidade, por permitir que eu realizasse o meu sonho de entrar para o mundo da pesquisa! Obrigada pelo seu apoio e orientação para a realização deste trabalho. Você me ajudou a ver que posso ir muito mais longe do que pensei.

Ao meu co-orientador Prof^o Dr. Alfio José Tincani, que foi responsável por realizar as coletas e que tornou tudo isso possível também, obrigada pelo apoio.

À minha mãe, Beth, que me incentivou e apoiou para que eu largasse tudo e seguisse meu sonho, obrigada por sempre se importar comigo a cada dia e querer sempre o meu melhor, obrigada por suas orações que sempre me mantiveram em pé, e obrigada por tudo que me ensinou como mãe, como pessoa e como um exemplo de mulher cristã. Obrigada por me ajudar a tornar-me uma pessoa melhor a cada dia. Te amo demais.

Ao meu pai, Carlos Roberto, que nem imagina o quanto me ajudou. Recordo-me que ao tirar minha primeira nota vermelha no boletim, quando criança, o seu castigo foi me fazer estudar todos os dias por no mínimo duas horas, resultado: nunca mais tirei uma nota vermelha na vida. Obrigada por me ajudar a chegar onde cheguei, você é um exemplo de caráter e pai. Amo você com todas as minhas forças.

Ao meu irmão, Carlos Henrique, por estar sempre ao meu lado e por ser o melhor irmão caçula do mundo, obrigada por todas as suas orações pela minha vida. Tenho muito orgulho de você e sei que seu futuro será brilhante! Te amo gordinho.

Ao meu marido, Luiz Filipe, que não importa o que viesse ele sempre esteve ao meu lado para me apoiar, para me consolar, para se alegrar comigo. Obrigada por tudo, sem o seu apoio e sem o seu incentivo eu não teria conseguido. Te amo e te amarei até que a morte nos separe.

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Genética Molecular do Câncer (GEMOCA): Natássia, Hélvia, Rita, Elaine, Raquel, Aline Carolina, Mariana, Angélica, Fernando, Renata, Laís, Karina e Murilo. Obrigada pela ajuda tanto intelectual como também pela ajuda que tantas vezes precisei na bancada. Agradeço por sempre estarem dispostos a me ajudar no que fosse preciso, sempre soube que podia contar com vocês. Obrigada pelos momentos de descontração, foram muitas as risadas que demos juntos, vocês fazem os meus dias no Gemoca serem muito mais divertidos.

Agradeço à Natássia, responsável pelo laboratório, agradeço imensamente pela oportunidade de estágio que você me concedeu há quatro anos atrás, sem você nada disso seria possível. Obrigada porque além de ser minha auxiliadora na execução deste trabalho, se tornou uma grande amiga.

À Marjory, por também ter se tornado uma amiga e por ter me ajudado na realização deste trabalho, obrigada por acreditar em mim.

Ao Lucas, que não só me ajudou a realizar a análise estatística como também me ajudou a compreendê-la!! Obrigada, aprendi muito com você.

Ao Fernando, que sempre esteve disposto em me ajudar não importa o quão ocupado estivesse. Obrigada pela sua paciência e disposição.

À Angélica, minha companheira de congressos, obrigada por também estar sempre disposta a me ajudar e pelos momentos de descontração que tivemos.

Agradeço ao Dr. Cláudio, que foi não só um colaborador no projeto, mas fez parte dele, sempre esteve envolvido e disposto a me ajudar. Obrigada por ter me recebido em seu laboratório, adorei trabalhar com vocês e espero poder continuar.

À Lisandra, que me ajudou muito na realização da análise sorológica deste trabalho, obrigada por ter me ensinado tantas coisas, aprendi muito com você. Obrigada por tudo.

Ao Dr. Leandro Lopes de Freitas e ao Dr. César Alvarenga Filho dos laboratórios MULTIPAT e IPC, respectivamente, que nos deu acesso aos blocos das amostras coletadas.

À CAPES pela bolsa concedida durante meu mestrado e à FAPESP, pelo apoio financeiro que tornou possível a realização deste trabalho.

"Depois de algum tempo você aprende... e descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que se deseja tornar, e que o tempo é curto. (...) Aprende que o tempo não é algo que possa voltar atrás. Portanto, plante você mesmo seu jardim e decore sua alma – ao invés de esperar eternamente que alguém lhe traga flores. E você aprende que, realmente, tudo pode suportar; que realmente é forte e que pode ir muito mais longe – mesmo após ter pensado não ser capaz. E que realmente a vida tem seu valor, e, você, o seu próprio e inquestionável valor perante a vida."

William Shakespeare

Agentes biológicos causadores de neoplasias humanas têm sido alvo de pesquisas científicas nos últimos anos, especialmente os vírus, considerados responsáveis pela causa de cerca de 20% de todos os tipos de cânceres em geral. No entanto os mecanismos pelos quais estes vírus causam tumores variam dependendo do tipo de sua espécie, da célula alvo e de fatores que concernem ao hospedeiro. Os herpes vírus, como o Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2), Epstein-Barr vírus (EBV), Citomegalovirus (CMV) e Herpesvirus Humano tipo 8 (HHV-8) têm sido associados com diversas neoplasias malignas e também com doenças autoimunes tireoidianas. O objetivo do nosso trabalho foi verificar a presença da infecção destes herpes vírus em nódulos tireoidianos benignos e malignos procurando indícios de uma possível associação com tumores tireoidianos. Foram coletadas amostras de tecido tumoral tireoidiano e soro de 153 portadores de nódulos de tireoide (136 mulheres e 17 homens, 46±15 anos) incluindo 65 tumores benignos (48 bóciolos, 17 adenomas foliculares), 79 tumores malignos (78 carcinomas papilíferos e 01 carcinoma folicular) e ainda 09 portadores de doença tireoidiana autoimunes (02 doenças de Graves e 07 tireoidites de Hashimoto). Também obtivemos 75 tecidos tireoidianos normais extraídos do lobo contralateral da lesão em 75 tumores correspondentes. Foi realizada análise sorológica por ELISA para detecção de anticorpos dos herpes vírus e foi realizada análise da Carga Viral por PCR em Tempo Real. Quarenta e cinco (29,4%) pacientes (45/153) possuíam anticorpos anti-HSV2; 83,7% anti-CMV (128/153); 98% anti-EBV (150/153) e nenhum paciente possuía anticorpos anti-HHV8. Não houve diferença sorológica entre os pacientes com nódulos malignos e benignos. Pacientes com metástase nos linfonodos apresentaram

maiores concentrações de anticorpos anti-CMV do que os pacientes que não tiveram metástase ($p=0,0038$). Pacientes coinfetados com o HSV-2 possuíam maiores concentrações de anticorpos anti-CMV do que pacientes que não estavam infectados pelo HSV-2 ($p=0,004$). Em relação à carga viral, os herpes vírus HSV-2, CMV e HHV-8 não foram encontrados em nenhum tecido tireoidiano da população estudada. No entanto, encontramos sequências de DNA do EBV em 20 amostras de tecidos tireoidianos (04 bócios, 03 DAIT e 13 CP). Embora a carga viral média fosse de 1068 cópias/ μ g nos casos malignos e de 374 cópias/ μ g nos casos benignos, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa. Foram encontrados também 6/75 (8%) casos positivos para a infecção por EBV nos tecidos normais. A carga viral foi, em média, maior nos tumores (126,5 cópias/ μ g) do que em seus respectivos tecidos normais (93 cópias/ μ g; $p=0,0207$). Não houve correlação entre a presença de EBV e as características clínicas ou de evolução dos pacientes. Embora, para melhor compreensão de seus mecanismos de ação, sejam necessários novos estudos moleculares e microbiológicos, a presença da alta carga viral do EBV nos tecidos tumorais tireoidianos em relação aos tecidos normais correspondentes sugere que este vírus pode exercer um papel no desenvolvimento de nódulos tireoidianos.

ABSTRACT

Biological agents that cause human cancers have been the subject of scientific research in recent years, especially viruses considered to be responsible for the cause of about 20% of all cancers in general. Although the mechanisms of latent infection and carcinogenesis vary depending on the particular virus, target cells, and host factors. Herpesviruses, such as Human Simplex Virus type 2 (HSV-2), Epstein - Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV) and Human Herpes Virus type 8 (HHV-8) have been associated with human malignancies and also with thyroid autoimmunity. We aimed to analyze the presence of these viruses in benign and malignant thyroid nodules looking for evidence of a possible association with thyroid tumors. Serum and thyroid specimens were prospectively collected from 153 thyroid nodule patients (136 females and 17 males, aged 46 ± 15 years) including 65 benign tumors (48 goiters and 17 follicular adenomas), 79 malignant tumors (78 papillary thyroid cancers and 01 follicular thyroid cancer) and also 09 patients with autoimmune thyroid disease (02 Grave's Disease and 07 Hashimoto's Disease). We also obtained 75 normal thyroid tissues extracted from 75 corresponding thyroid tumors. We used ELISA to screen all patients for the presence of the viruses and a real-time quantitative PCR (qPCR) technique to analyze thyroid tissues viral load on antibody-positive patients. Forty-five (29.4%) patients (45/153) presented anti-HSV2 antibodies; 83.7% anti-CMV (128/153); 98% anti-EBV (150/153) e no patient presented antibodies anti-HHV8. There were no serological differences within benign and malignant thyroid patients. Patients with lymph node metastasis showed higher CMV antibodies levels than those patients with no metastasis presence ($p=0,0038$). Patients HSV-2 coinfectad had

higher CMV antibodies level than those patients that was not infected by HSV-2 ($p=0,004$). Concerning about viral load, there was no evidence of the presence of HSV-2, CMV and HHV-8 in the population studied. Nevertheless we found EBV's DNA sequences in 20 thyroid tissue samples. Even though the average malignant viral load was 1068 copies/ μg in 13 cases and 374 copies/ μg in 7 benign cases, there was no statistically significant difference between groups. We also found 6 (8%) positive cases for EBV viral load out of 75 normal tissues. In paired test the viral load median was higher in tumors (126.5 copies/ μg) than in their respective normal tissues (93 copies/ μg ; $p=0.0207$). We did not find any association among the presence of EBV and/or its viral load and any clinical or pathological feature. Although molecular studies are needed to a better comprehension of the mechanisms underlying the relation between EBV and thyroid nodules, the presence of high EBV copy numbers in thyroid tumors, especially in PTC cases, in comparison with normal tissues, suggests that this virus may play a role in the development of thyroid nodules.

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Adenomas Foliculares
ATM	do inglês – Ataxia Telangiectasia Mutated
CDT	Carcinomas Diferenciados da Tireoide
CF	Carcinomas Foliculares
CP	Carcinomas Papilíferos
CPC	Carcinomas Papilíferos Clássicaa
CPVCA	Carcinomas Papilíferos Variantes de Células Altas
CPVF	Carcinoma Papilífero de Variante Folicular
CMV	Citomegalovírus
DAIT	Doenças Tireoidianas Autoimunes
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DG	Doença de Graves
EUA	Estados Unidos da América
EBNA-1	do inglês - Epstein-Barr virus nuclear antigen 1
EBV	Epstein-Barr
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
GEMOCA	Laboratório de Biologia Molecular do Câncer
HHV	do inglês – Human Herpes Virus
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV-1	Herpes Simplex Vírus tipo 1
HSV-2	Herpes Simplex Vírus tipo 2
LANA	do inglês - latency-associated nuclear antigen

LMP-1	do inglês - latent membrane protein 1
NF-κB	do inglês – nuclear factor κB
HHV-8	do inglês - Human Herpesvirus type 8
HPV	do inglês - Human Papilomavirus
KSHV	do inglês - Kaposi's Sarcoma Herpesvirus
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
SEER	do inglês: Surveillance, Epidemiology, and End Results
TH	Tireoidite de Hashimoto
TPV	Tanapoxvirus
TNM	do inglês – Tumor Size, Nodes, Metastasis
TNFR	receptor do fator de necrose tumoral
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
US	Ultra-Som
VZV	Varicela-Zoster

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1 – Espécies de herpes vírus que infectam os seres humanos	30
Tabela 2 - Descrição completa dos kits de ELISA utilizados	49
Tabela 3 - Descrição dos primers utilizados.....	49
Tabela 4 - Concentrações iniciais de DNA viral em cópias/ μ l dos controles positivos comerciais.....	50
Tabela 5 - Características clínicas descritivas de todos os pacientes. Os dados estão expressos em números absolutos e classificados de acordo com o gênero F-Feminino e M-Masculino e de acordo com a idade.....	59
Tabela 6 – Análise estatística quantitativa (Mann-Whitney) dos resultados sorológicos de HSV-2, EBV e CMV	69
Tabela 7 – Descrição das características clínico-patológicas dos pacientes EBV Positivos nos tumores malignos e benignos de tireoide.....	73

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma.	23
Figura 2 - Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.	24
Figura 3 - Causas dos Cânceres em Geral. Os vírus representando 20% do total.....	27
Figura 4 - Vírus oncogênicos como o HSV, EBV e o Poliomavírus são capazes de interferir no metabolismo celular..	29
Figura 5 – Estrutura básica dos herpes vírus.....	31
Figura 6 - Esquema da replicação dos herpes vírus na fase lítica.....	32
Figura 7 - Esquema da diluição seriada dos controles positivos herpes vírus.....	51
Figura 8 - Reta de Regressão Linear obtida através da diluição seriada dos controles positivos.....	53
Figura 9 - Ampliação da figura 8, onde a curva padrão foi validada, passando pelos parâmetros de qualidade.....	54
Figura 10 - Reprodutibilidade e sensibilidade da curva, realizada em quadriplicata (cada curva sincronizadamente em cima da outra).....	54
Figura 11 - Ampliação da imagem dos resultados fornecidos pelo software, onde utiliza-se os valores de Ct da curva padrão (Standard) como base para calcular a carga viral das amostras clínicas.....	56

Figura 12 - Visão Geral dos resultados sorológicos da infecção por herpes vírus nos pacientes portadores de nódulos tireoidianos malignos e benignos versus a incidência na população brasileira.....	61
Figura 13 - Diferença da quantidade de anticorpos anti-CMV nos grupos de pacientes portadores de tumores malignos e benignos.....	62
Figura 14 - Diferença da quantidade de anticorpos anti-EBV nos grupos de pacientes portadores de tumores malignos e benignos.....	63
Figura 15 – Diferença das concentrações de anticorpos anti-CMV nos pacientes HSV-2 positivos e dos HSV-2 Negativos.....	65
Figura 16 - Diferença da quantidade de anticorpos anti-CMV presente nos pacientes que apresentaram metástase nos linfonodos ao diagnóstico versus pacientes sem metástase	66
Figura 17 - Diferença dos títulos de anticorpos anti-EBV e anti-CMV nos grupos de pacientes portadores de tumores malignos e benignos.....	67
Figura 18 – Diferença dos títulos de anticorpos anti-EBV e anti-CMV no grupo de pacientes portadores de nódulos benignos	68
Figura 19 - Gráfico de correlação de Pearson entre os títulos de anticorpos anti-EBV e anti-CMV	69
Figura 20 - Carga Viral do EBV nos nódulos tireoidianos malignos e benignos.....	71
Figura 21 - Carga Viral do EBV nos tumores e tecidos normais tireoidianos	72

SUMÁRIO

	PÁG.
1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Câncer de Tireoide.....	23
1.1.2 Fatores de Risco para o CDT.....	25
1.2 Vírus e Câncer	27
1.3 Estrutura e Replicação dos Herpes vírus	30
1.4 Herpes Simplex Vírus tipo 2	33
1.5 Epstein-Barr Vírus.....	34
1.6 Citomegalovírus	35
1.7 Herpes vírus Humano tipo 8.....	37
1.8 Herpes vírus e Câncer de Tireoide	40
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Casuística.....	46
3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão de Pacientes com Nódulos Tireoidianos.....	47
3.3 Análise Sorológica por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): determinação da soro epidemiologia dos herpes vírus nos pacientes com nódulos tireoidianos	48
3.4 Otimização da PCR em Tempo Real Quantitativa - Carga Viral	49
3.4.1 Determinação da concentração dos <i>primers</i> e sondas	49
3.4.2 Diluição Seriada para Construção da Curva Padrão.....	50

3.5 Determinação da Carga Viral por PCR em Tempo Real Quantitativa nos Pacientes com Nódulos Tireoidianos	52
3.5.1 Coleta e extração de DNA das amostras clínicas	52
3.5.2 Determinação da Carga Viral nos pacientes com nódulos tireoidianos	55
3.6 Análise dos resultados	56
4. RESULTADOS	58
4.1 Dados Clínicos e Epidemiológicos.....	59
4.2 Análise sorológica por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): determinação da soro epidemiologia dos herpesvírus nos pacientes com nódulos tireoidianos	60
4.3 Análise Gênica: Carga Viral por PCR em Tempo Real Quantitativa.....	70
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Tireoide

O câncer de tireoide é considerado um câncer relativamente raro, responsável por 2 a 5% do total de tumores detectados em mulheres (1). No entanto, a incidência do câncer diferenciado de tireoide (CDT) tem aumentado significativamente no Brasil, assim como em praticamente todo o mundo, nos últimos anos. Em 2014, estima-se a ocorrência de 1.150 novos casos de câncer de tireoide para o sexo masculino e 8.050 para o sexo feminino (Figura 1). Na região Sul do Brasil, o CDT é a quarta neoplasia mais frequente nas mulheres, com 16 novos casos para cada 100 mil habitantes. Nas regiões sudeste, nordeste e norte do Brasil o CDT é o sexto colocado nas mulheres, sendo a quinta neoplasia mais incidente em todo o território nacional (Figura 1) (1).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
			Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
Próstata	68.800	22,8%	 		Cólon e Reto	17.530	6,4%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Estômago	12.870	4,3%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Estômago	7.520	2,7%
Esôfago	8.010	2,6%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Laringe	6.870	2,3%			Ovário	5.680	2,1%
Bexiga	6.750	2,2%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Leucemias	5.050	1,7%			Leucemias	4.320	1,6%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%					

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma. Adaptado de: INCA, 2014(1)

A incidência do CDT varia amplamente, tanto em diferentes países quanto dentro de um mesmo país. A figura 2 ilustra as diferenças observadas nas capitais em relação aos estados.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

Figura 2. Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. Fonte: INCA, 2014(1)

De semelhante modo vem sendo descrito em outros países, no Brasil, a incidência é seguramente influenciada pelo acesso ao sistema de saúde (2). No entanto, é notória a diferença de incidência mesmo entre estados de similar qualidade em termos de serviço de saúde (3). Existem, ainda, dados mostrando que a incidência do CDT para o sexo feminino é de cerca de quatro vezes maior do que em homens em regiões mais desenvolvidas (como América do Norte e Europa), sendo este câncer mais comumente encontrado durante a 3ª e 4ª década de vida (2, 4, 5). Dados do SEER revelam que embora a mortalidade do câncer de tireoide tenha se mantido estável desde 1975 a sua incidência triplicou nos EUA, principalmente em mulheres, com uma proporção de quase quatro mulheres para cada homem. Não restam dúvidas quanto à importância de métodos de imagem, cada vez mais empregados, como a ultrassonografia (US), que tem grande sensibilidade para detecção de tumores pequenos cuja evolução clínica é incerta e que provavelmente representam um grande número de casos anteriormente ignorados e que provavelmente nunca evoluiriam clinicamente (2). Entretanto, o aumento dessa incidência do CDT não pode ser exclusivamente atribuído ao maior e melhor acesso ao sistema de saúde, nem a métodos mais sensíveis podendo ainda existir outras causas desconhecidas (2, 6).

1.1.2 Fatores de Risco para o CDT

É comprovado que uma baixa exposição à radiação ionizante é suficiente para aumentar o risco de CDT (7). Diversos estudos já mostraram que a radiação provoca danos críticos ao DNA, causando apoptose ou mesmo instabilidade genômica, originando aneuploidias, deleções, ampliações, etc., e que todas essas mutações dão origem a tumores, inclusive o câncer de tireoide (7, 8).

O iodo é outro fator de extrema importância para o desenvolvimento de CDT, atuando de diferentes formas de acordo com as concentrações consumidas (9). A deficiência de iodo causa hiperplasia da glândula da tireoide, provocando bócio e é associada com o aumento do risco para o desenvolvimento do carcinoma folicular de tireoide (CFT). No entanto, quem consome iodo em excesso pode aumentar o risco para carcinoma papilíferos da tireoide (CP) (10, 11).

Algumas substâncias químicas parecem ser fatores de risco para o câncer de tireoide, como por exemplo, a exposição aos agentes químicos associados a explosões vulcânicas, como vanádio, selênio, zinco, cádmio e tiocinatos de enxofre, pois a incidência de CDT aumenta de duas a três vezes em áreas vulcânicas (12).

Existem ainda outros fatores que atualmente têm sido alvo de estudos, incluindo fatores biológicos, como os vírus (Figura 3).

Causas dos Cânceres em Geral

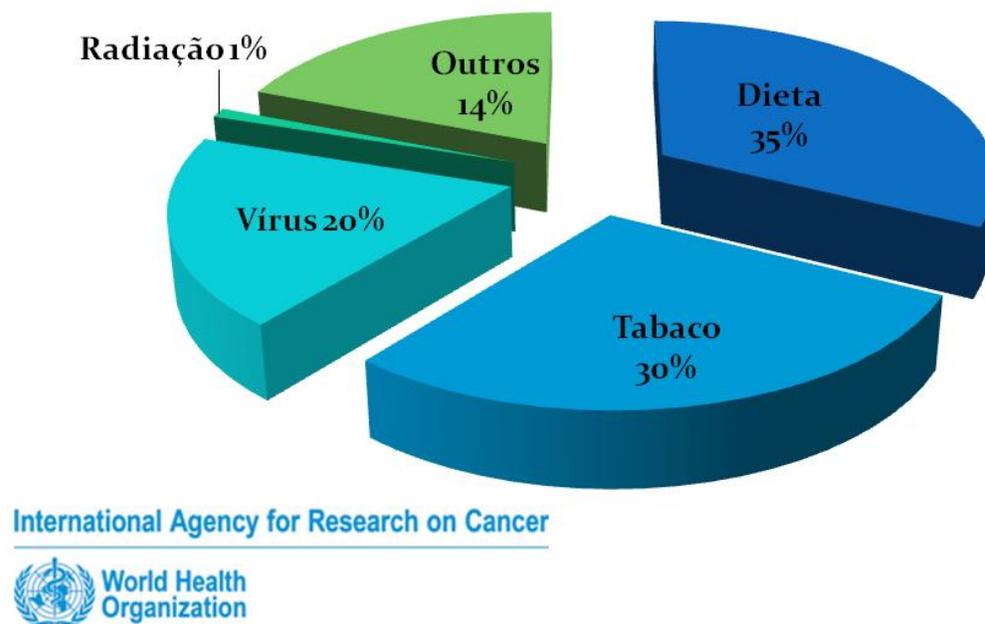


Figura 3. Causas dos Cânceres em Geral. Os vírus representando 20% do total. Modificado de IARC, 2003 (13)

1.2 Vírus e Câncer

A primeira evidência de que os vírus poderiam causar câncer foi obtida em 1910, quando Rous descobriu um tipo de sarcoma que podia ser transmitido entre aves (14). Cerca de 40 anos mais tarde, confirmou-se que este sarcoma era transmitido por um tipo de vírus que, quando implantado em ratos saudáveis através um filtrado livre de células obtido de tumores malignos, ocasionavam câncer (15).

Determinadas neoplasias malignas, como o câncer gástrico, câncer de fígado, câncer de útero, leucemias e linfoma de Burkkit, podem ser originadas de infecções virais em tecidos de células-tronco adultas, pois esses vírus, ao inserir seu material genético na célula hospedeira, alteram o metabolismo das células infectadas, modificando suas vias de sinalização e fazendo com que a célula continue proliferando, porém sem se diferenciar (16). Vários estudos demonstraram a presença de vírus em cânceres humanos, como o Papiloma Vírus Humano (HPV) em câncer de colo de útero, o Epstein-Barr Vírus (EBV) em carcinoma da nasofaringe e câncer gástrico, o Tanapoxvírus (TPV) em cânceres de ovário, mama, próstata, osteosarcomas, melanomas, glioblastomas e câncer colorretal (17-20) e, ainda, o Citomegalovírus (CMV) em câncer de mama (21).

Tsai e colaboradores mostraram não somente a presença de CMV em tumores, mas também de outros cinco tipos de vírus: Herpes Simplex Vírus-1 (HSV-1), Herpes Simplex Vírus-2 (HSV-2), EBV, HPV e Herpesvírus Humano-8 (HHV-8), a partir da análise de amostras de câncer de mama, tumores benignos da tireoide e comparação com população controle (21).

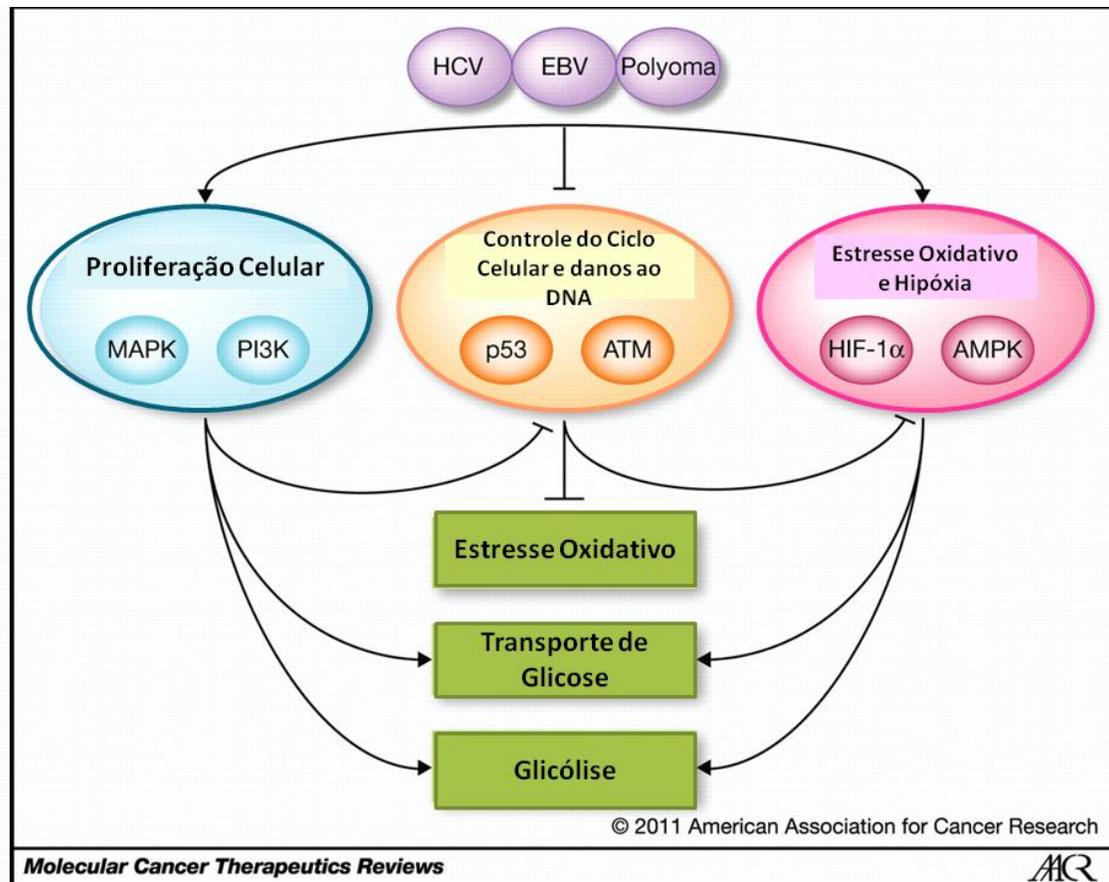


Figura 4. Vírus oncogênicos como o HSV, EBV e o Poliomavírus são capazes de interferir no metabolismo celular. Modificado de Noch & Khalili, 2012 (22)

No que diz respeito ao CDT, Jensen e colaboradores encontraram infecção frequente pelo HSV-1 e HSV-2 (24). Estes autores também relataram que durante a progressão do tumor, as células tumorais tireoidianas adquiriam um aumento da suscetibilidade ao HSV devido ao aumento da expressão da nectina-1 (uma imunoglobulina de moléculas de adesão presentes em células epiteliais, neuronais e fibroblastos, principal mediador de entrada do HSV nas células hospedeiras) e a ativação dos sinais mitóticos (23). Giaginis e colaboradores mostraram que receptores do coxsackievírus e do adenovírus também estavam presentes em grande parte dos pacientes com lesões benignas e malignas

de tireoide, sugerindo até mesmo o uso da detecção destes receptores virais no diagnóstico de malignidade (24).

1.3 Estrutura e Replicação dos Herpes vírus

A família *Herpesviridae* é composta por mais de 100 espécies, no entanto apenas oito delas infectam os seres humanos (Tabela 1) (25).

Tabela 1 - Espécies de herpes vírus que infectam os seres humanos. Fonte: Arvin, 2007 (25)

Nome Comum	Designação	Sigla	Subfamília
Herpes Simplex Vírus tipo 1	Herpes vírus humano 1	HSV-1	α
Herpes Simplex Vírus tipo 2	Herpes vírus humano 2	HSV-2	α
Vírus da Varicela-Zoster	Herpes vírus humano 3	VZV	α
Epstein-Barr Vírus	Herpes vírus humano 4	EBV	γ
Citomegalovírus	Herpes vírus humano 5	CMV	β
Herpes vírus humano 6	Herpes vírus humano 6	HHV-6	β
Herpes vírus humano 7	Herpes vírus humano 7	HHV-7	β
Kaposi's Sarcoma associated Human Herpes vírus (KSHV)	Herpes vírus humano 8	HHV-8	γ

A estrutura básica dos herpes vírus é comum entre eles. Possuem forma helicoidal de DNA em dupla hélice, envolvida por capsídeo icosaédrico e circundada por uma substância amorfa (tegumento), além do envelope lipídico, em que se expressam as

glicoproteínas de superfície do HHV. Tudo isso para garantir a proteção e a sobrevivência do vírus como demonstra a figura 5.

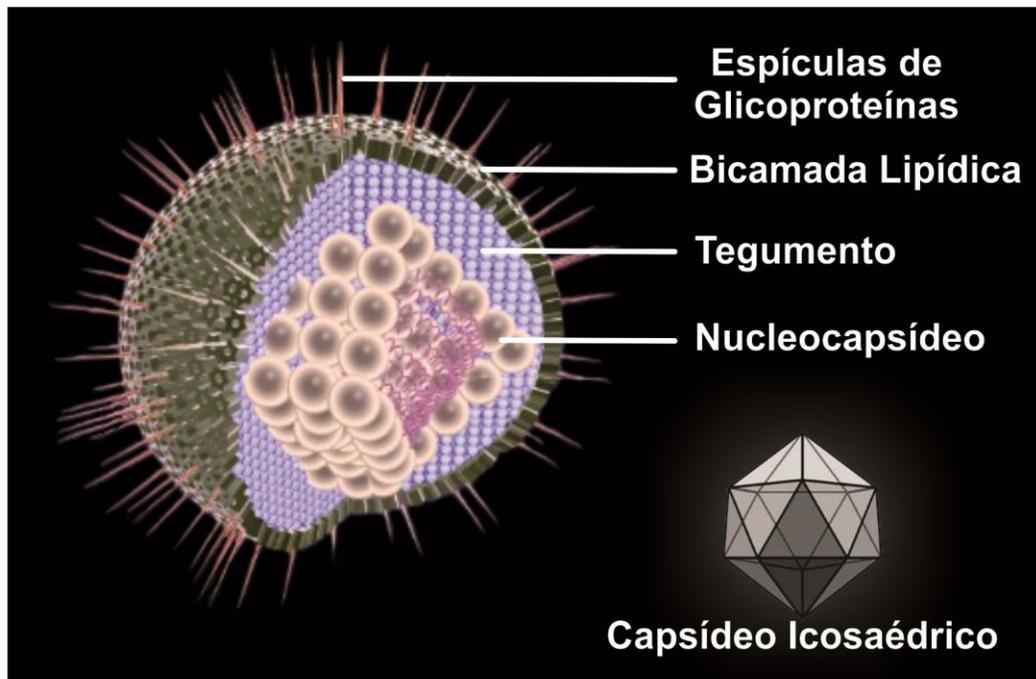


Figura 5. Estrutura básica dos herpes vírus. Fonte: Arvin, 2007 (25)

Os herpes vírus possuem duas formas de infecção em seus hospedeiros: utilizando a reprodução lisogênica (forma latente) e a reprodução lítica (forma ativa da doença). Em ambos os processos, o vírus envelopado funde-se com a membrana plasmática da célula hospedeira através de receptores específicos e ocorre a incorporação do capsídeo viral para dentro do citoplasma da célula. O restante do vírus fica para fora, com a membrana, tegumento e *spikes* (glicoproteínas). O capsídeo então é degradado e o DNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira, a partir daí pode ocorrer tanto a reprodução lítica quanto a lisogênica. No ciclo lisogênico, o DNA viral fica latente, sem se replicar dentro da célula hospedeira, sem danificá-la. Pode ocorrer infecção em uma forma chamada epissomal, onde o DNA viral fica em forma circular e unido a ele mesmo, sem se

integrar no DNA da célula hospedeira; e uma forma integrada, onde o DNA viral irá se ligar no DNA da célula hospedeira. Já na replicação lítica, irá ocorrer replicação dos vírus dentro da célula hospedeira, causando lise da membrana e consequente morte celular, e, neste caso, ocorrerão manifestações clínicas (Figura 6).

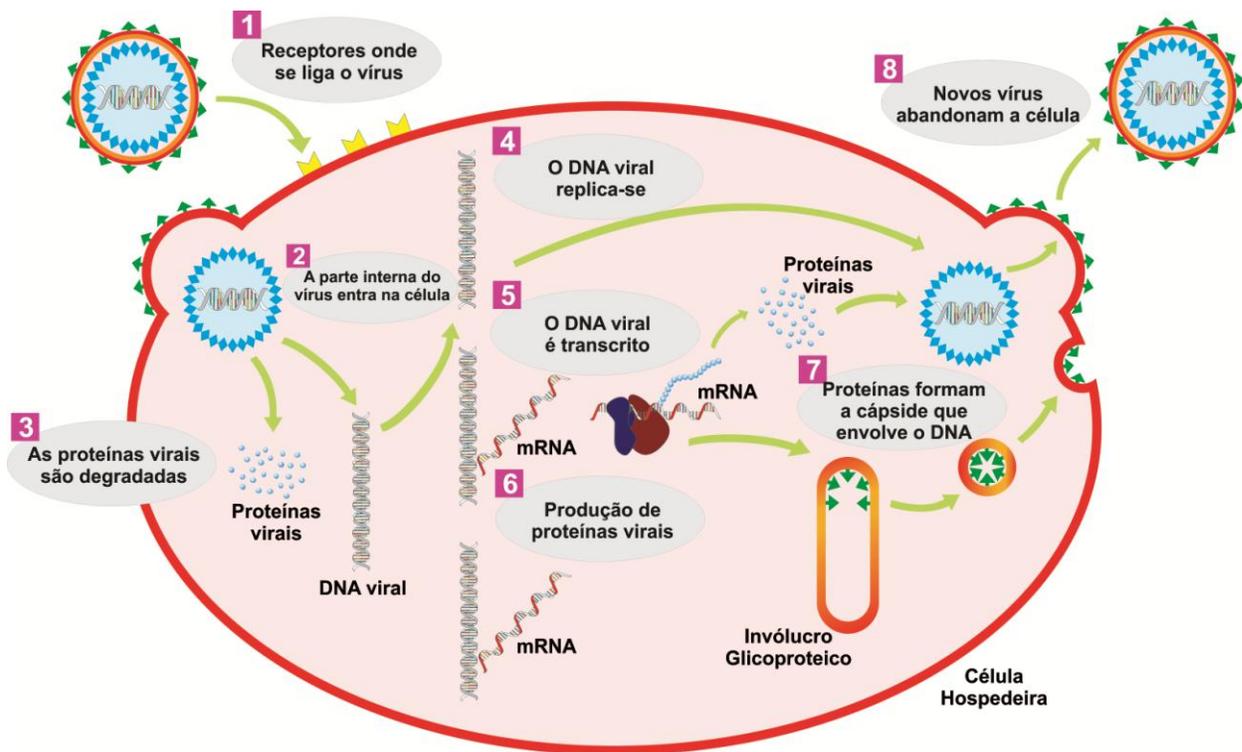


Figura 6. Esquema da replicação dos herpes vírus na fase lítica.

1.4 Herpes Simplex Vírus Tipo 2

O HSV-2 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* do gênero *Simplexvirus*. Esta subfamília tem como principal característica manter a infecção latente nos gânglios sensoriais, podendo também infectar diversas outras células humanas, como fibroblastos e células da epiderme nas infecções líticas, que servem como pontos de transmissão do vírus em outros indivíduos; já no caso de infecções latentes, infectam os neurônios (25).

O genoma do HSV é grande o suficiente para codificar aproximadamente 80 proteínas. O HSV codifica glicoproteínas essenciais para a fixação viral e também para escapar do ataque imunológico do indivíduo infectado. Ele consegue fazer isso graças à ligação da porção Fc da imunoglobulina G (IgG) a um complexo de proteínas virais, camuflando, assim, a presença dos vírus e de células infectadas e limitando a ação dos anticorpos (26).

A principal via de entrada do HSV é através da fusão das membranas pelo receptor chamado Nectina-1. Através dela o vírus tem acesso à célula hospedeira, e libera proteínas que promovem o início da transcrição e replicação gênica viral. Para o caso de infecções latentes, os genes transcritos estão relacionados ao estado de latência. Dessa forma, a replicação viral só ocorre se o vírus for ativado, ou seja, quando passar a expressar as proteínas de fase lítica que darão início à reprodução do vírus (27).

Jensen e colaboradores (23) vêm demonstrando um papel importante de HSV-1 e HSV-2 em tumores benignos e malignos da tireoide e apresentaram, na reunião da

Endocrine Society em Boston, em 2011, evidências de uma ação dos HSV-2 sobre os mecanismos de reparo celular da célula folicular (28).

1.5 Epstein-Barr Vírus

O Herpesvírus Humano-4 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, do gênero *Lymphocryptovirus*, e foi descoberto em 1964, pelos pesquisadores Epstein e Barr, recebendo, portanto, também o nome de Epstein-Barr Vírus (EBV). Em 1997, o EBV e o HHV-8 foram reconhecidos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC) como agentes carcinogênicos humanos. A presença do EBV ocorre em cerca de 95% da população mundial adulta (29). Este vírus é reconhecido como agente etiológico da mononucleose infecciosa (30) e já foi associado ao Linfoma de Burkkit, a doenças linfoproliferativas pós-transplante, linfomas de células T e *Natural Killer*, e ao linfoma de Hodgkin, tendo predileção por células epiteliais e levando ao desenvolvimento de alguns cânceres, como o carcinoma de nasofaringe e gástrico (31).

O EBV possui um genoma de 172Kb, constituído de DNA dupla fita, que, assim como os outros herpesvírus, produz proteínas para uma forma latente, em que o vírus fica alojado no núcleo sob a forma epissomal; e para uma fase lítica, na qual o vírus se torna ativo e produz partículas infecciosas (31-33). O seu primeiro local de infecção e replicação é a orofaringe, garantindo o seu principal meio de transmissão através da saliva (34). O EBV tem sido detectado em todas as partes do mundo (32), mas é mais prevalente em adolescentes e jovens (34).

As principais proteínas latentes de membrana que o EBV expressa após a infecção são a EBNA 1 (sigla do inglês *Epstein-Barr virus nuclear antigen 1*) e a LMP1 (sigla do inglês: *latent membrane protein 1*) (35, 36). A proteína EBNA 1 é uma das primeiras a serem expressas, e é uma das proteínas latentes mais expressas nos tumores associados à infecções virais, tanto que sua detecção é utilizada no diagnóstico laboratorial da mononucleose infecciosa (35, 36). A EBNA 1 possui papel essencial na replicação do DNA viral e manutenção da forma epissomal (latência) (35, 36). A LMP1 também é a principal proteína oncogênica, chave para a indução de metástase no câncer da nasofaringe. A LMP1 regula diversos genes envolvidos no processo metastático como, por exemplo, VEGF, COX-2, E-caderina, MMPs, c-Met e EGFR, que através da ativação do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), desencadeiam a ativação de diversas vias de transdução de sinais, como NF- κ B, AP-1, ets-1, MAPKs, JAK/STAT e PI3K/AKT (35, 36).

Diversos estudos já mostraram a associação do EBV a diversos tumores malignos, como o carcinoma hepático, esofágico e principalmente na região da cabeça e pescoço como os carcinomas da nasofaringe, hipofaringe e laringe, sendo a incidência dos últimos dois mais raros (37, 38). Não existem, até o momento, estudos de tal vírus em CDT.

1.6 Citomegalovírus (CMV)

O Citomegalovírus (CMV), também chamado de Herpesvírus Humano-5 (HHV-5), pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Bethaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus*. Foi descrito pela primeira vez em 1904 por Ribbert, que identificou

grandes inclusões celulares no rim e nas glândulas parotidas de um natimorto com sífilis em 1888. Quase duas décadas depois, Goodpasture & Tabolt (39) sugeriram que essas alterações celulares observadas eram parecidas com as lesões de pele causadas pelo Herpesvírus Humano-3 (Varicela-Zoster). Mais uma década se passou e Farber & Wolbach (40) foram os primeiros a associar a doença das glândulas salivares ao vírus, já que o mesmo parecia ter uma propensão a induzir lesões celulares características nos ductos salivares. Finalmente, na década de 1950 o vírus foi isolado pela primeira vez (41-43).

O CMV é considerado o maior vírus de sua família, possuindo um diâmetro de 200nm. Seu material genético é constituído de DNA dupla fita, com aproximadamente 230Kb, que codifica cerca de 200 proteínas. Assim como os outros herpesvírus, o CMV possui uma fase de infecção lítica e outra latente (44). A sua replicação começa cerca de 12 horas após a infecção, sendo que nas primeiras 2 a 4 horas o vírus produz proteínas chamadas “imediately-early” (IE ou α), que são essenciais na transcrição e replicação viral. Após um período de cerca de 24 horas as proteínas produzidas são as “early” (E ou β), que exercem papel regulatório e função enzimática, e são primordiais na replicação contínua do DNA viral como, por exemplo, a DNA polimerase. Já após um período tardio, de 36 a 48 horas após a infecção, são produzidas as proteínas “late” (L ou γ), que participam do processo da montagem do vírus e da produção de novos vírus (44).

A incidência de CMV é alta no Brasil, chegando a 93% da população e sendo mais prevalente em indivíduos de baixa renda (45). Já em países europeus, na Austrália e na América do Norte a incidência é menor, com 40 a 60% de indivíduos infectados (46). A sua transmissão possui amplo espectro, podendo ser: via parenteral, através de sangue e de

fluídos corporais; contato entre pessoas, pela pele; transmissão vertical, de mãe para filho; e através de transplantes de órgãos (46).

A infecção pelo CMV produz expressão de HLA-DR (sigla do inglês *Human Leukocyte Antigen - D region*) em células tireoidianas foliculares, agindo como células apresentadoras de antígeno aos linfócitos T e induzindo uma resposta imunológica, podendo, assim, estar envolvido com o surgimento de doenças tireoidianas auto-imunes (46). O CMV também já foi descrito em tumores benignos da tireoide e em câncer de mama (21).

1.7 Herpesvírus Humano tipo 8

O HHV-8 foi descrito pela primeira vez em 1994, por Chang e colaboradores, em tecidos de Sarcoma de Kaposi (SK), doença neoplásica da pele, de um paciente com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (47). Desde então, este vírus tem sido encontrado em praticamente todos os casos de SK, independente de suas variantes, passando a ser chamado de Herpesvírus Associado ao Sarcoma de Kaposi (48). É categorizado como pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, do gênero *Rhadinovirus*, e tem como principal característica de grupo a transformação celular e a capacidade de causar lesões tumorais ao seu hospedeiro (49). Os alvos do HHV-8 são os linfócitos B (células de defesa) e as células endoteliais vasculares (50, 51).

A distribuição do HHV-8 é endêmica no continente Africano, chegando a até 100% de soropositividade em algumas regiões como a Costa do Marfim, 89% em Gâmbia e 40% em Uganda e Nigéria. Na Europa central sua incidência menor, com 3 a 35% de

infectados em países do Mediterrâneo, como Grécia e Itália. Nos Estados Unidos a infecção varia de 5 a 25%, dependendo da região. Já no sudeste Asiático e na América Central (região do Caribe) a incidência é ainda mais baixa, com cerca de 2 a 4% da população acometidos (52-57). Entretanto, em estudo recente, Zhang e colaboradores mostraram que a prevalência do HHV-8 numa determinada região rural da China chegou a 20,2% (58). Souza e colaboradores, em 2013, estudaram 780 indígenas da Amazônia (Brasil), Guiana Francesa e Equador na América do Sul, e identificaram a prevalência do vírus (subtipo E) em 80% dos adultos, e dentre eles 65,24% foram do Brasil, e nenhum dos nativos infectados com o HHV-8 apresentou SK (59).

A transmissão pode ocorrer de forma horizontal, sexual, vertical, por contato sanguíneo e através de órgãos transplantados (60). Dedicoat e colaboradores observaram que há casos de soro prevalência do vírus em crianças da África do Sul em que a mãe era soronegativa para HHV-8, o que sugere a transmissão também através da saliva (61). A carga viral do vírus mostrou ser maior em amostras salivares do que em outras amostras (62). O vírion completo do HHV-8 mede cerca de 150nm de diâmetro, com simetria icosaédrica formada por 162 capsômeros protéicos e um envelope que se assemelha a outros herpesvírus humanos, sendo homólogo ao herpesvírus humano tipo 4 (EBV). Seu material genético é formado por DNA de cadeia dupla que codifica aproximadamente 100 proteínas diferentes, com um comprimento de cerca de 165Kb (63, 64).

O HHV-8 possui, como os outros herpes vírus, uma fase lítica e uma fase latente. Durante a fase latente o genoma viral se encontra em forma circular chamada de epissomal, em que há baixa expressão protéica. Já na fase lítica, o genoma viral assume

novamente sua forma linear e passa a ter alta atividade na síntese protéica. Essa mudança de fase ocorre em geral em indivíduos imunodeprimidos (65, 66).

O genoma do vírus contém cerca de 25% de seus genes adquiridos de células hospedeiras durante a sua evolução. Estes genes homólogos aos do hospedeiro garantem a sua sobrevivência no organismo infectado e participam do processo de oncogênese. Os homólogos virais imitam o efeito das proteínas hospedeiras e utilizam isso para manipular o ambiente hospedeiro a seu favor. Isso gera diversos efeitos biológicos, tais como alterações nos genes de resposta imune, gerando genes anti-apoptóticos e genes de transformação celular e proliferação, conforme mostrado na tabela 1 (65, 67).

A fase de latência é mantida pela proteína viral que recebe o nome de antígeno nuclear associado à latência (LANA – sigla do inglês: *latency-associated nuclear antigen*), provavelmente por ter um papel na invasão imune, inibindo a apresentação do antígeno às células de defesa (68, 69). A proteína LANA também mantém o número de cópias dos plasmídeos virais, tanto para replicação quanto para a inativação da proteína supressora tumoral p53 produzindo um efeito anti-apoptótico, garantindo, assim, a proliferação e sobrevivência celular. Outras proteínas de fase de latência são: a ciclina-D viral homóloga (v-cyc), inibidor de FLICE (v-FLIP), fator regulador de interferon viral 1 e 3 (vIRF1/vIRF3), homólogo da interleucina 6 (vIL-6), Kaposi B, entre outros (68, 69).

Além de ser o agente etiológico do sarcoma de Kaposi, o HHV-8 está associado à doença multicêntrica de Castleman (MCD), um tipo de linfoma que acomete as células B de defesa; e também ao linfoma de efusão primária (PEL), uma desordem linfoproliferativa rara, encontrada principalmente em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência

humana (HIV) (70). Outros estudos mostraram a presença do vírus em mieloma múltiplo, doença febril, sarcoidose, e em raros casos de falência de medula óssea, todos encontrados, principalmente, em pacientes concomitantemente imunodeprimidos pela infecção do HIV e transplantados de órgãos (70). Não encontramos estudos do vírus em CDT.

1.8 Herpes vírus e Câncer de Tireoide

Nosso grupo já estudou a presença dos herpesvírus humanos tipo 6 (HHV-6) e tipo 7 (HHV-7) em doenças tireoidianas auto-imunes, como a doença de Graves. Neste estudo também foi comparada a herança de polimorfismos dos genes *GSTP1*, *CYP1A1* e *72TP53* com a presença da infecção por HHV-6 e HHV-7, demonstrando-se que a infecção do HHV-7 é um fator de risco para essa doença em indivíduos que possuem as variantes desses genes (71). Além disso, nosso grupo estudou a presença do HSV-1 e HHV-6 em pacientes transplantados renais imunossuprimidos, concluindo que a herança genética do alelo polimórfico Prolina no códon 72 do gene *TP53* aumenta o risco para a infecção do HHV-6 nestes pacientes (72).

Outros herpesvírus já foram estudados em doenças tireoidianas autoimunes como o EBV e o CMV (73, 74). Thomas e colaboradores estudaram 34 crianças portadoras de DAIT e 31 crianças saudáveis como grupo controle e demonstraram que os níveis séricos dos anticorpos anti-HSV-2, anti-EBV, anti-CMV e anti-HHV-6 foram maiores e mais prevalentes em crianças com doenças autoimunes do que em crianças saudáveis (73). A presença do EBV e sua reativação em pacientes com Doença de Graves estimula o aumento da produção de anticorpos pelos linfócitos B aumentando a predisposição ao

aumento de TRAb nestes pacientes, causando conseqüentemente um agravamento da doença (74).

O único herpesvírus já estudado em CDT foi o HSV-2, onde Jensen e colaboradores encontraram uma prevalência de 39,4% de 109 amostras de tecidos tumorais infectados com o vírus (23).

Apesar da presença sérica dos herpesvírus em pacientes com doenças tireoidianas autoimunes ser conhecida na literatura mundial, não se sabe ao certo a frequência com que estes vírus podem infectar de fato as células do tecido tireoidiano. Uma característica comum à família *Herpesviridae*, é a capacidade de causar infecção latente, que persiste por toda a vida do indivíduo. Cada subfamília dos herpesvírus estudadas possui tropismo por uma célula diferente. O HSV-2, da subfamília *alphaherpesvirinae*, infecta células nervosas sensoriais e tem como reservatório os gânglios nervosos; o EBV e o HHV-8, por pertencerem à mesma subfamília *gammaherpesvirinae*, são atraídos e infectam linfócitos B e, portanto seus reservatórios são os linfonodos; e o CMV, por sua vez, da subfamília *betaherpesvirinae*, causam infecções latentes nas glândulas secretórias, principalmente as salivares e nos rins, sendo o seu principal reservatório as glândulas salivares.

Diante desse contexto, dada a alta prevalência dos herpesvírus nos pacientes com DAIT e dada a proximidade anatômica dos reservatórios dos vírus com as glândulas tireoidianas, e uma vez que os vírus estudados já foram relacionados com outras neoplasias, questionamos se de fato poderiam também estar relacionados às neoplasias tireoidianas.

Esta dissertação poderá abrir novas possibilidades de pesquisas, que incluam o estudo de RNA ou proteínas virais eventualmente associadas a efeitos oncogênicos nas células e tecidos tumorais tireoidianos, que poderão elucidar os mecanismos envolvidos na carcinogênese tireoidiana, assim como prover elementos úteis no diagnóstico, na avaliação da evolução clínica e prognóstico destes pacientes, uma vez comprovada a presença dos herpesvírus nos tecidos tumorais dos pacientes com nódulos tireoidianos.

2.OBJETIVOS

Objetivo Geral

Identificar a presença da infecção de HSV-2, EBV, CMV e HHV-8 em tecidos tumorais de pacientes com nódulos tireoidianos, buscando evidências de uma possível relação entre estas infecções e o desenvolvimento de CDT.

Objetivos Específicos

- Identificar a soroprevalência dos HSV-2, EBV, CMV e HHV-8 em pacientes com nódulos tireoidianos.
- Nos pacientes com sorologia positiva, investigar a carga viral dos vírus estudados em amostras de tecidos tireoidianos.
- Comparar os resultados obtidos com características clínico-patológicas dos pacientes estudados.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Trata-se de um estudo prospectivo. Todos os pacientes que participaram deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Informado conforme as determinações dos Comitês de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP que aprovaram esta linha desta pesquisa (parecer 982/2011).

Foram coletadas amostras de tecido tumoral tireoidiano e soro de 153 indivíduos (136 mulheres e 17 homens, 46 ± 15 anos) com indicação de cirurgia devido a nódulos em tireoide, incluindo 65 tumores benignos (48 bóciós, 17 adenomas foliculares); 09 doenças tireoidianas autoimunes (DAIT) sendo 02 doenças de Graves e 07 Tireoidites de Hashimoto e 79 tumores malignos (78 carcinomas papilíferos e 01 carcinoma folicular). Também obtivemos 75 tecidos tireoidianos normais extraídos do lobo contralateral da lesão de 75 tumores correspondentes (dos tumores incluídos nesta casuística). Os dados referentes ao tumor, como tipo histológico, variante, tamanho do nódulo, invasão, presença de cápsula, metástase ao diagnóstico, foram obtidos através de revisão do exame anatomopatológico do paciente. Todos os pacientes foram operados pelo mesmo cirurgião Profº Dr. Alfio José Tincani, seguindo um padrão de coleta: as cirurgias foram realizadas pela mesma equipe de profissionais, o sangue foi coletado pela punção da veia jugular durante a cirurgia e os tumores foram acondicionados em tubos criogênicos e transportados em nitrogênio líquido para posterior armazenamento em freezer – 80°C.

3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão de Pacientes com Nódulos

Tireoidianos

Foram incluídos neste estudo indivíduos que tiveram nódulo tireoidiano primário e passaram por tireoidectomia parcial ou total. Estes pacientes seguiram um protocolo-padrão implantado no serviço que inclui uma ficha na qual constam, além de dados de identificação, idade no diagnóstico, sexo, etnia, dados clínicos pré-cirúrgicos, tabagismo, uso de medicamentos e drogas, exames realizados (ultrassom, pesquisa de corpo inteiro com iodo131, punção aspirativa por agulha fina), dados referentes à cirurgia e do exame anatomopatológico (medida do tumor, tipo histológico, grau de diferenciação e presença de linfonodos metastáticos).

Utilizamos como critério para estadiamento da doença a classificação proposta por Sobin & Wittekind (75), que se baseia no clássico método TNM, isto é, tamanho do tumor (T), acometimento de nódulos cervicais (N) e metástases à distância (M).

Os critérios de exclusão foram: indivíduos que possuíam histórico de exposição (acidental ou médica) à radiação ionizante ou de DAIT prévia (sem presença de nódulos) e antecedentes de outras malignidades. Todos os dados, incluindo o diagnóstico de outras doenças concomitantes, foram confirmados nos prontuários dos pacientes. Foram excluídos deste estudo 09 pacientes com DAIT.

3.3 Análise sorológica por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): determinação da soro epidemiologia dos herpes vírus nos pacientes com nódulos tireoidianos

Foi realizada análise sorológica de todos os 153 pacientes portadores de nódulos tireoidianos. A técnica utilizada foi o ensaio imunoenzimático ELISA indireto, que consiste na detecção de anticorpos, demonstrando se o paciente já esteve em contato com o vírus. O método utilizado para realizar o teste se baseia na interação antígeno-anticorpo, de acordo com protocolos conhecidamente padronizados e já realizados por nosso grupo (76). A descrição dos kits consta na tabela 2.

Todos os kits para ELISA utilizados neste trabalho são para uso diagnóstico, com exceção do HHV-8. O kit da marca *Focus Diagnostics®*, USA é validado especificamente para diagnóstico do herpes vírus tipo 2 (HSV-2), ou seja, é garantido que não há reações cruzadas com o HSV-1, ao contrário dos demais kits do mercado. Com isso garantimos que os indivíduos analisados estavam infectados com o HSV-2 e não apenas com o HSV-1 que é extremamente frequente na população. Este kit (Focus®), assim como o kit da *Advanced Biotechnologies®*, USA são para testes qualitativos, ou seja, fornecem resultados positivos ou negativos para a infecção viral, e por isso seus resultados foram analisados pelo teste T de student ou Fisher. Já os kits da *Biomérieux®*, USA e *Diasorin®*, Italy são testes quantitativos, que nos fornece a quantidade de anticorpos presente no soro do paciente em UA/ml, por isso analisamos as médias de anticorpos pelos testes de Mann-Whitney e Wilcoxon.

Tabela 2 - Descrição completa dos kits de ELISA utilizados.

Vírus	Código do kit	Descrição do kit	Marca
HSV-2	EL0920G	HerpeSelect® 2 IgG	Focus Diagnostics
EBV	P001606	ETI-VCA-G 96 testes	Diasorin
CMV	30204	VIDAS CMV IgG 60 testes	Biomérieux
HHV-8	15-501-000	KSHV/HHV-8 IgG	Advanced Biotechnologies

3.4 Otimização da PCR em Tempo Real Quantitativa - Carga Viral

3.4.1 Determinação da concentração dos *primers* e sondas

Todos os *primers* foram desenhados e obtidos comercialmente (*Applied Biosystems, USA*), as referências de identificação constam na tabela 3. Todas as sequências dos genes foram blastadas no banco de dados do NCBI, certificando-se assim que nenhum gene fosse homólogo a outro vírus, eliminando reações falso-positivas. Os genes escolhidos como alvos foram previamente estudados em outros trabalhos da literatura (77-82).

Tabela 3 - Descrição dos primers utilizados:

Vírus	Cepa	Genbank/NCBI	Gene	ID Applied*
HSV-2	G	M16321.1	UL30-DNA Polimerase	AIFASH8
CMV	-	NC_006273. 2	UL83	AICSV5S
EBV	B95-8	NC_007605.1	EBNA1	AIBJXZK
HHV-8	-	AF360120. 1	ORF73	AID1UB0

* Os primers foram customizados pela empresa *Applied Biosystems, USA*. Sendo assim não temos acesso a sua sequência, obtemos apenas o número de identificação.

3.4.2 Diluição Seriada para Construção da Curva Padrão

Para a construção da curva padrão foi utilizado um controle positivo contendo um número de cópias virais obtido comercialmente, ou seja, um purificado previamente quantificado com uma concentração conhecida de todos os vírus (*Advanced Biotechlogie®*, *Columbia, USA*). As concentrações iniciais estão descritas na tabela 4.

Uma vez obtido o controle positivo com uma alta concentração de cópias virais, foi realizada, então, a diluição seriada, com diversas concentrações de 1 a 5, conforme ilustrado na figura 7.

Tabela 4 - Concentrações iniciais de DNA viral em cópias/ μ l dos controles positivos comerciais.

Vírus	Concentração do Controle Positivo (cópias virais/μl)*
HSV-2	$1,5 \times 10^4$
CMV	$1,6 \times 10^4$
EBV	$1,9 \times 10^4$
HHV-8	$1,2 \times 10^4$

* Fornecido pela empresa *Advanced Biotechnologies®*, *USA*.

Diluição Seriada 1:10

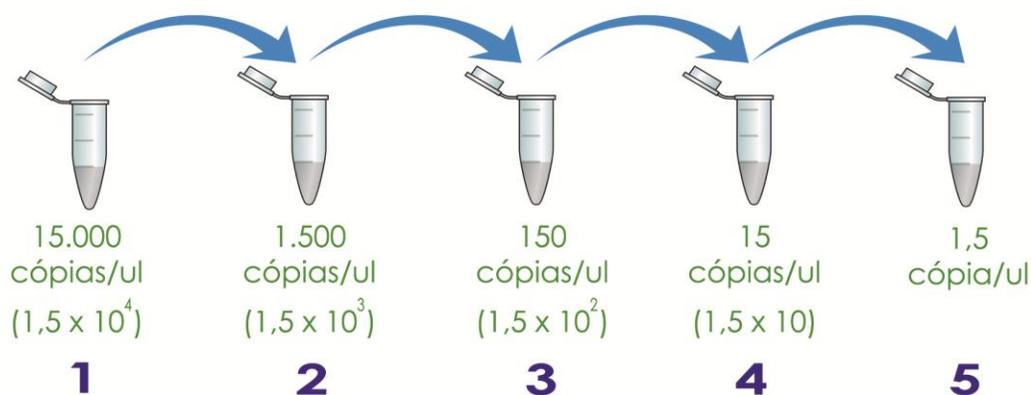


Figura 7. Esquema da diluição seriada dos controles positivos herpes vírus

Primeiramente construímos a curva padrão a partir da diluição seriada para sua validação. A quantificação do número de cópias dos vírus nas diluições foi realizada através do cálculo da média dos valores *threshold* do ciclo (*Ct*) obtidos para cada amostra clínica e a respectiva “plotagem” destes nas retas de regressão linear obtidas a partir das curvas-padrão de cada vírus.

Como controle de qualidade foi considerado aceitável uma reta de regressão linear com um índice de correlação de 0,99 conforme mostrado na figura 8, onde se obteve um *slope* de -3,33 e $R^2 = 0,993$, considerados ótimos (ampliado na figura 9). Outro parâmetro analisado para a otimização da curva é a sua reprodutibilidade, por isso foi realizada quadruplicata de cada uma das diluições conforme ilustrado na figura 10.

3.5 Determinação da Carga Viral por PCR em Tempo Real Quantitativa nos Pacientes com Nódulos Tireoidianos

3.5.1 Coleta e extração de DNA das amostras clínicas

Nos pacientes soropositivos para a infecção de qualquer um dos vírus (HSV-2, EBV, CMV e HHV-8), tanto nos nódulos tireoidianos benignos quanto malignos, foi extraído o DNA do respectivo tumor de cada paciente. A técnica utilizada foi a extração de DNA de tecido fresco por fenol/clorofórmio. Após a extração, o DNA então foi analisado pelo Pico Drop® para avaliar a qualidade e a quantidade do DNA obtido. Para análise da presença de DNA viral no genoma humano pela quantificação da carga viral por PCR em Tempo Real foi necessário diluir-se o DNA extraído da amostra clínica em uma concentração de 10ng/μl, utilizando-se água Milique®.

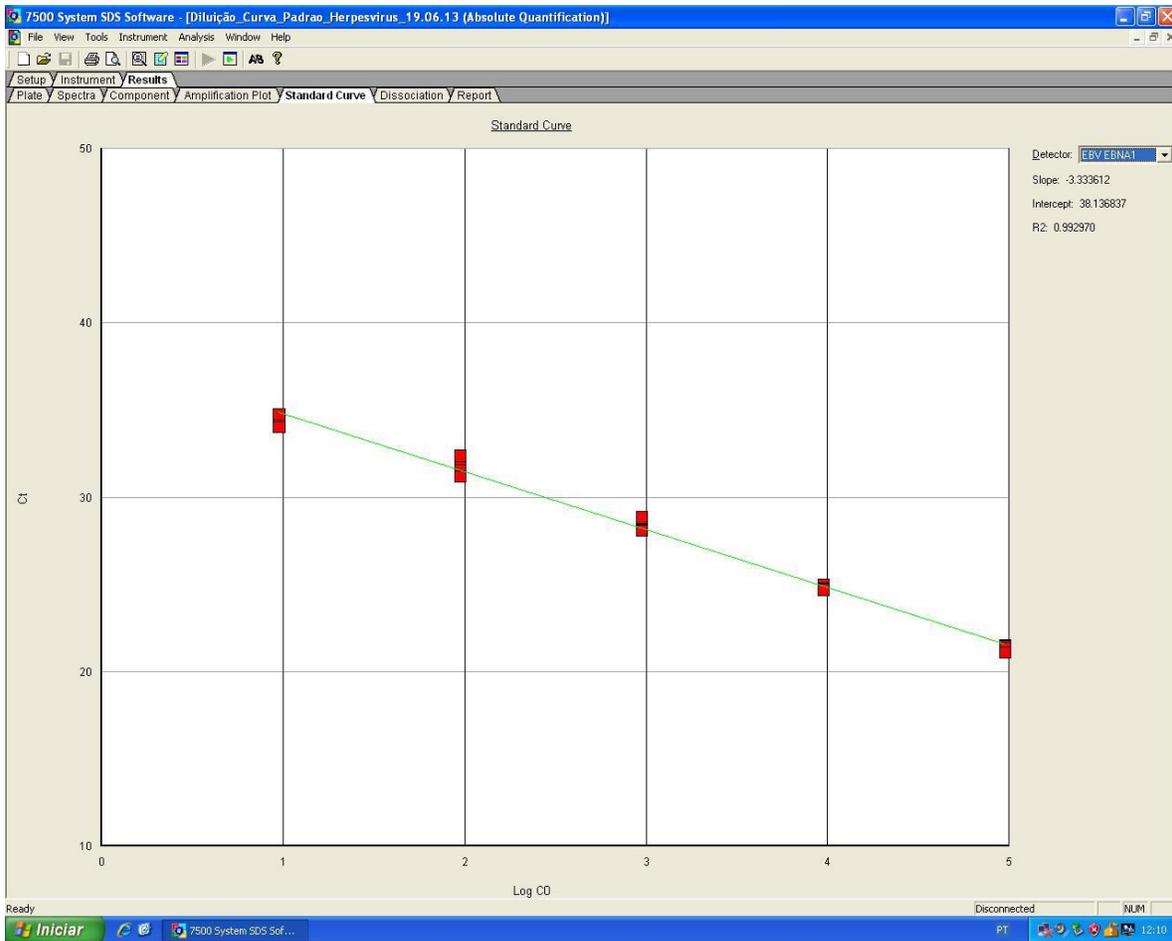


Figura 08. Reta de Regressão Linear obtida através da diluição seriada dos controles positivos.

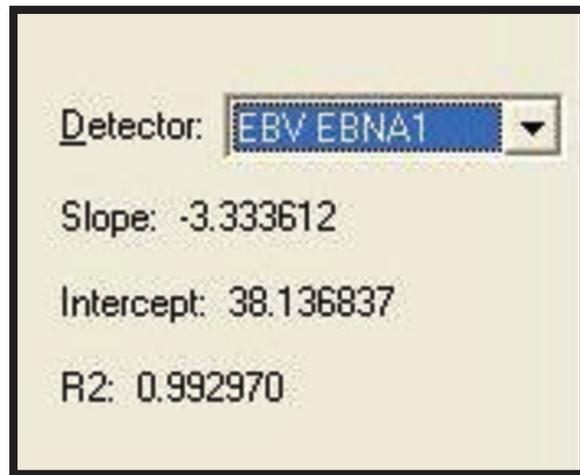


Figura 09. Ampliação da figura 8, onde a curva padrão foi validada, passando pelos parâmetros de qualidade.

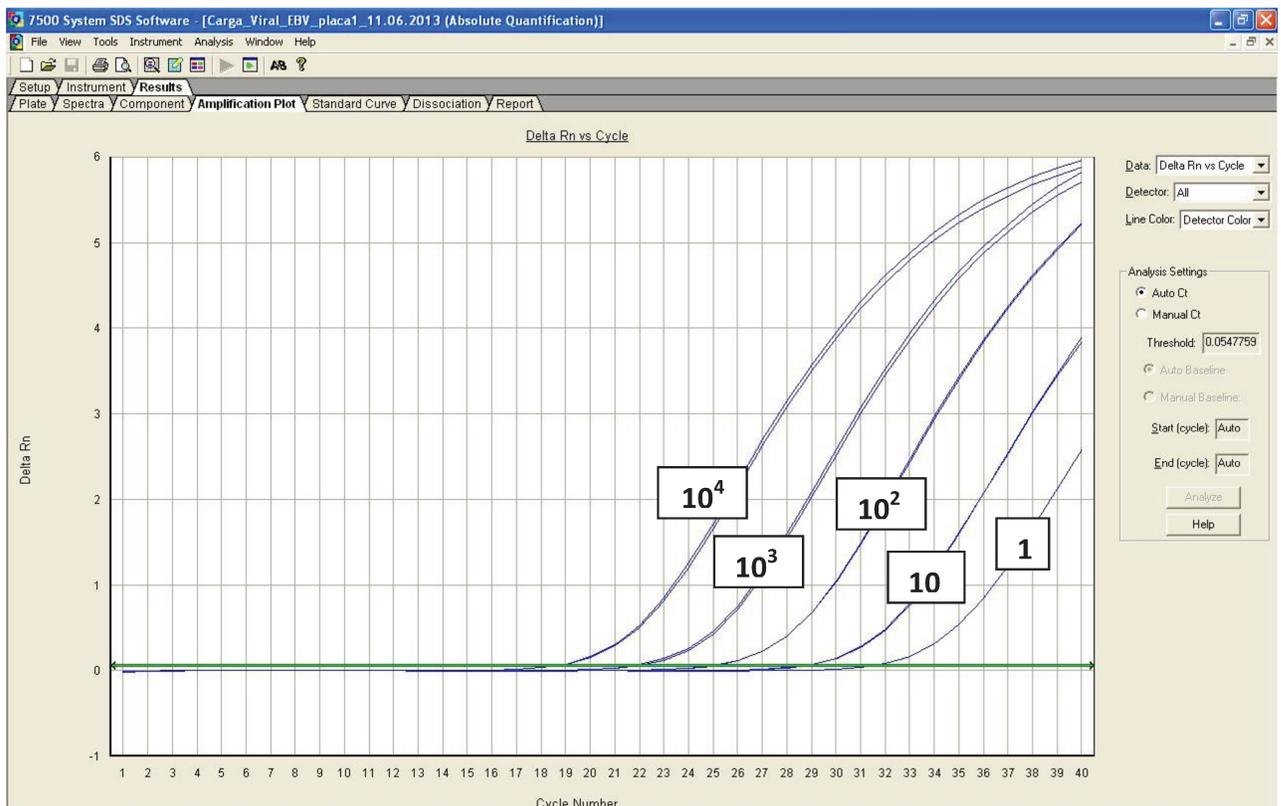


Figura 10. Reprodutibilidade e sensibilidade da curva, realizada em quadruplicata (cada curva sincronizada uma sobreposta à da outra).

3.5.2 Determinação da Carga Viral nos pacientes com nódulos tireoidianos

Tendo validado a curva, foi realizada então a carga viral das amostras clínicas. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, tanto as diluições para a nova construção da curva quanto para as amostras clínicas.

A cada placa de PCR em tempo real realizada foram incluídas as diluições para construção de uma nova curva padrão, que também seguiu o mesmo controle de qualidade $slope = -3,3$, ou o mais próximo possível, e correlação linear mais próximo de 1,0, sendo aceitáveis valores acima de 0,99.

O software fornece estimativas de carga viral com base na curva padrão. A quantificação do número de cópias dos vírus em DNA tumoral das amostras foi realizada através do cálculo da média dos valores *threshold* do ciclo (*Ct*) obtidos para cada amostra e sua respectiva plotagem nas retas de regressão, comparando esses valores de *Ct* das amostras com os controles positivos, estimando-se assim o valor da carga viral da amostra como mostra figura 11.

Os resultados são expressos pelo software na mesma unidade dos controles positivos comerciais, ou seja, em cópias/ μ l. No entanto existe uma tabela de conversão, onde 20 cópias/ml equivalem a 3 cópias/ μ g, que já vem sendo utilizada em estudos anteriores (83, 84). Por tumores tireoidianos serem tumores sólidos, o mais correto seria expressar os resultados em cópias/ μ g. Para isso convertemos os resultados de cópias/ μ l para cópias/ml, multiplicando por mil e por fim de cópias/ml para cópias/ μ g realizando uma regra de três simples, multiplicando o resultado por 3 e dividindo por 20, por exemplo: 2,93 cópias/ μ l x 1000 = 2.930 cópias/ml; $(2.930 \times 3) \div 20 = 439,50$ cópias/ μ g.

Quantificação dos controles positivos (Curva-Padrão)

Amostra clínica positiva com carga viral de mais de 50 milhões de cópias/ul.

Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Otv
A1		EBV EBNA1	Standard	18.53		95000.00
A2		EBV EBNA1	Standard	18.48		95000.00
A3		EBV EBNA1	Standard	21.97		9500.00
A4		EBV EBNA1	Standard	21.66		9500.00
A5		EBV EBNA1	Standard	24.94		950.00
A6		EBV EBNA1	Standard	25.01		950.00
A7		EBV EBNA1	Standard	28.60		95.00
A8		EBV EBNA1	Standard	28.62		95.00
A10		EBV EBNA1	Standard	31.33		9.50
A11		EBV EBNA1	NTC	Undet.		
A12		EBV EBNA1	NTC	Undet.		
B1		EBV EBNA1	Unknown	33.50		2.53
B2		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		
B3		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		
B4		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		
B5		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		
B6		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		
B7		EBV EBNA1	Unknown	9.43		5.71e+007
B8		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		
B9		EBV EBNA1	Unknown	34.37		1.37
B10		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		
B11		EBV EBNA1	Unknown	Undet.		

Figura 11. Ampliação da imagem dos resultados fornecidos pelo software, onde utiliza-se os valores de Ct da curva padrão (Standard) como base para calcular a carga viral das amostras clínicas.

3.6 Análise dos resultados

Para a realização da análise estatística foi utilizado o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 16.0, Chicago, USA, 1989-2007. Testes exatos de qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fisher (F) foram usados para examinar a homogeneidade entre os casos e os controles com relação ao sexo, etnia, tabagismo e para as cargas virais. Os testes de Mann-Whitney ou Wilcoxon foram usados para se comparar a idade, sorologia e carga viral entre diferentes grupos. O odds ratio (OR) e o coeficiente de intervalo de 95% “confidence interval- CI” foram usados para indicar o risco que um

indivíduo portador de determinado vírus tem para desenvolver CDT em relação ao grupo controle. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

4.RESULTADOS

4.1 Dados clínicos e epidemiológicos

Dentre os 153 casos coletados, 89% dos pacientes eram do sexo feminino (n=136) e 11% (n=17) do sexo masculino com uma proporção de oito mulheres para cada homem. Dentre os pacientes portadores de nódulos benignos (n=74), a idade média foi de 48 ± 16 (média \pm desvio padrão) anos, e entre os portadores de nódulos malignos (n=79), a idade média foi de 43 ± 14 anos.

Foram analisados 65 tumores benignos (48 bóciós, 17 adenomas foliculares) e 09 DAITs, sendo 02 doenças de Graves e 07 Tireoidites de Hashimoto. Além disso, foram estudados 79 tumores malignos (78 carcinomas papilíferos e 01 carcinoma folicular). A distribuição histológica dos casos incluídos bem como informações relativas gênero e idade encontram-se na tabela 5. Os casos de DAIT foram excluídos da análise estatística. Em relação ao estadiamento pTNM (75), 45 CDT foram classificados como I ou II, os restantes não possuíam informações suficientes para a classificação de estadio TNM.

Tabela 5- Características clínicas descritivas de todos os pacientes. Os dados estão expressos em números absolutos e classificados de acordo com o gênero F-Feminino e M-Masculino e de acordo com a idade.

Tipo Histológico	Número de Pacientes	Gênero		Idade (anos)	
		F	M	≤ 45	> 45
Nódulos Benignos	74				
Bócio nodular	48	26	05	09	22

Adenoma Folicular	17	08	0	06	02
Tireoidite de Hashimoto	07	06	01	04	03
Doença de Graves	02	02	0	02	0
Nódulos Malignos	79				
Carcinomas Papilíferos	78				
<i>Forma Clássica</i>	58	51	07	34	24
<i>Variante Folicular</i>	12	11	01	04	08
<i>Variante Células Altas</i>	01	01	0	01	0
<i>Variante Células Oxifílicas</i>	04	01	03	0	04
<i>Variante Esclerosante</i>	03	03	0	01	02
Microcarcinoma Papilífero	13	11	02	04	09
Carcinoma Folicular	01	01	0	0	01

4.2 Análise sorológica por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): determinação da soro epidemiologia dos herpesvírus nos pacientes com nódulos tireoidianos

Foram analisados 153 amostras de soro pela técnica de ELISA. Quarenta e cinco (29,4%) pacientes (45/153) possuíam anticorpos anti-HSV2; 83,7% anti-CMV (128/153); 98% anti-EBV (150/153) e nenhum paciente possuía anticorpos anti-HHV8, o que é compatível com as estimativas esperadas na população brasileira como mostradas na figura 12. Não houve diferença significativa da sorologia dentre os grupos malignos e benignos, pois dentre os pacientes portadores de nódulo benignos (n=74), 19 (26%) pacientes eram soropositivos para HSV-2, 69 (93%) positivos para CMV, 72 (97%) para

EBV. Já dentre os tumores malignos (n=79), 15 (19%) eram soropositivos para HSV-2, 70 (89%) para CMV e 78 (99%) para EBV (Figura 13 e 14).

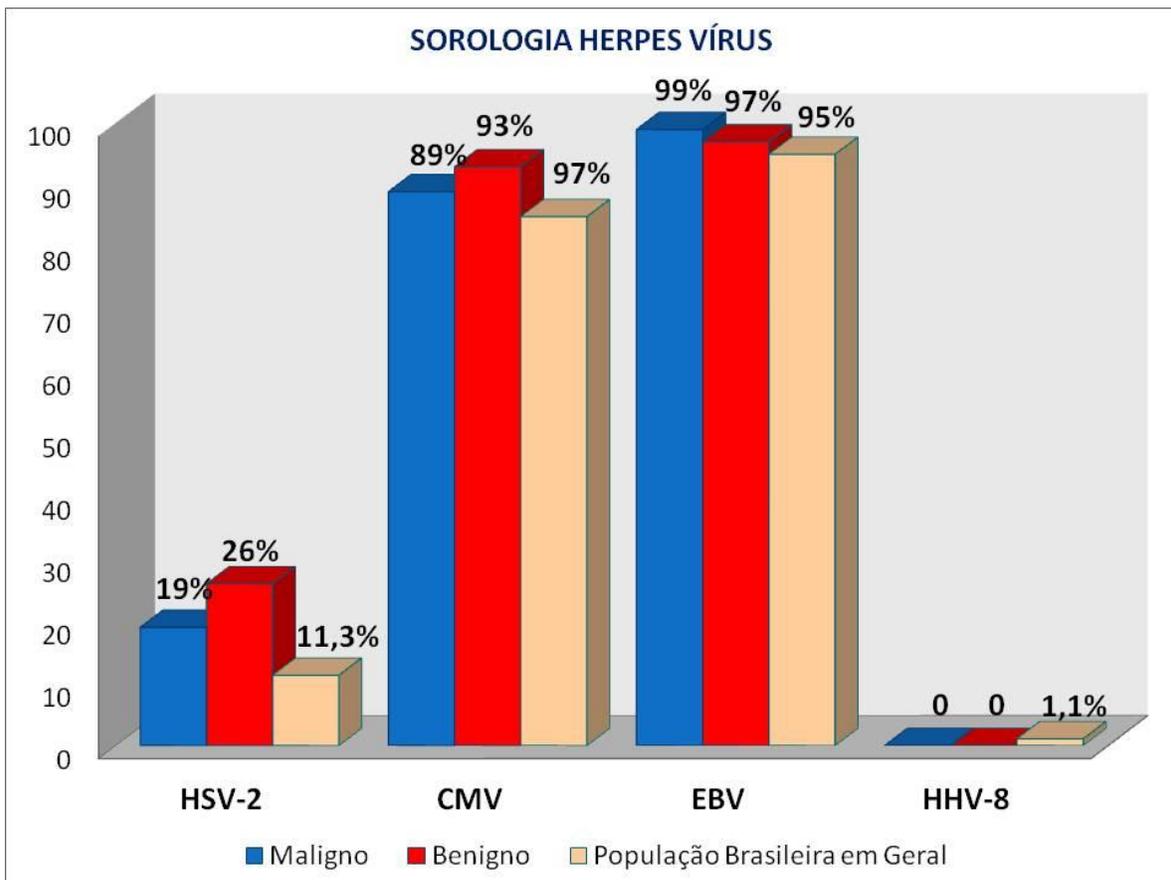


Figura 12. Visão Geral dos resultados sorológicos da infecção por herpes vírus nos pacientes portadores de nódulos tireoidianos malignos e benignos versus a incidência na população brasileira.

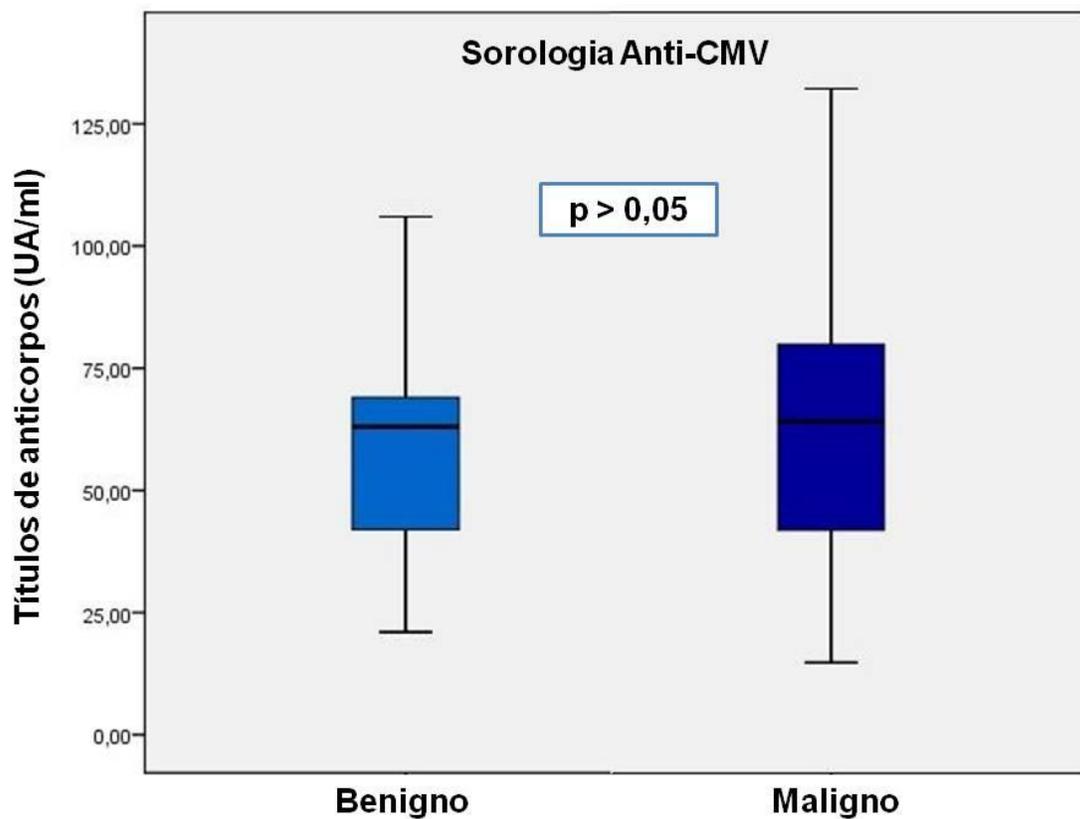


Figura 13. Diferença da quantidade de anticorpos anti-CMV nos grupos de pacientes portadores de tumores malignos e benignos

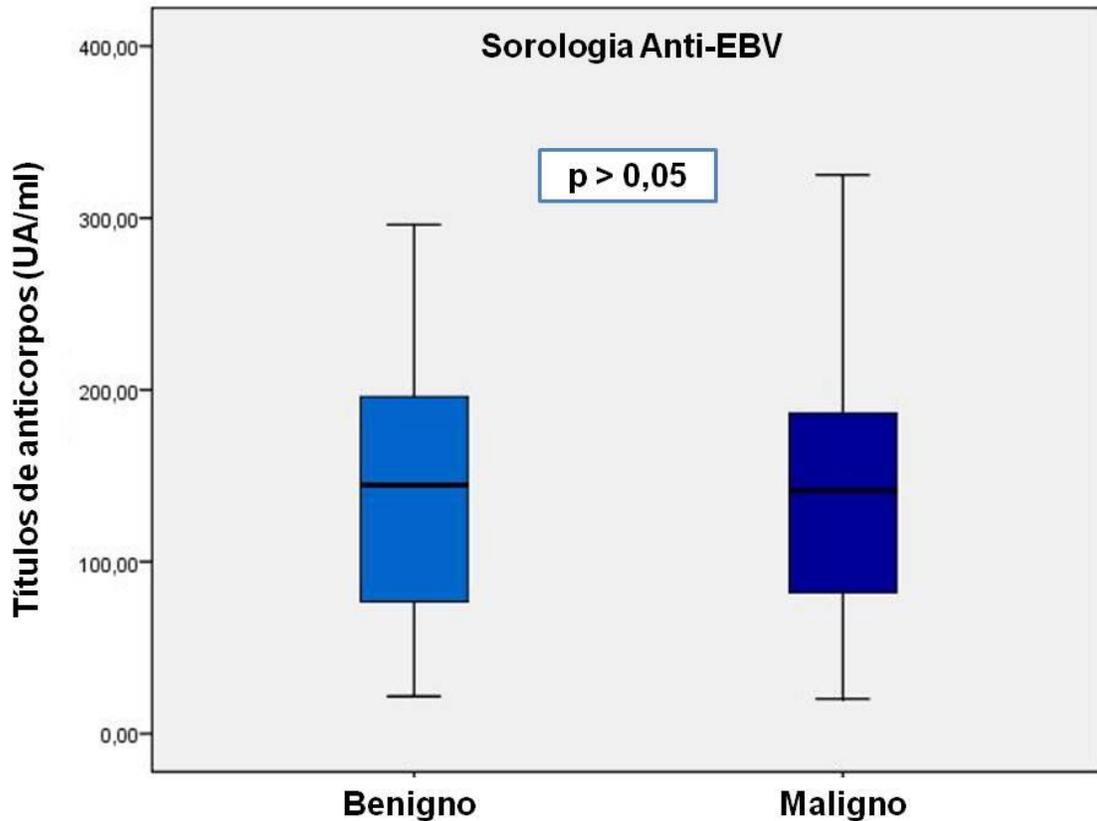


Figura 14. Diferença da quantidade de anticorpos anti-EBV nos grupos de pacientes portadores de tumores malignos e benignos

No entanto, ao analisar as quantificações dos anticorpos em grupos com diferentes características tumorais, pudemos observar que pacientes portadores de nódulos não encapsulados possuíam uma tendência a apresentar maiores quantidades de anticorpos anti-EBV (150 ± 71 UA/mL) do que pacientes com nódulos encapsulados (108 ± 71 UA/mL), no entanto essa diferença não foi significativa ($p=0,057$, Mann-Whitney). Pacientes com sorologia positiva para HSV-2 apresentaram maiores quantidades de anticorpos anti-CMV (67 ± 26 UA/mL) do que pacientes negativos para este vírus (62 ± 30 UA/mL; $p=0,004$, Mann-Whitney) conforme mostrado na figura 15. Pacientes que tiveram metástase nos

linfonodos ao diagnóstico tinham menores quantidades de anticorpos anti-CMV (44 ± 18 UA/mL) quando comparados a pacientes sem metástases ao diagnóstico (67 ± 33 UA/mL; $p=0,0038$, Mann-Whitney) como mostra a figura 16. Tanto nos pacientes com nódulos malignos quanto com benignos as médias das quantidades de anticorpos anti-EBV (141 ± 81 UA/mL) foram maiores do que as médias de anticorpos anti-CMV (56 ± 34 UA/mL; $p<0,0001$, Mann-Whitney) como mostram as figuras 17 e 18. Também observamos maiores quantidades de anticorpos anti-EBV quanto maior era a sorologia anti-CMV ($p=0,010$ Pearson) conforme mostra o gráfico de dispersão na figura 19. Entretanto em relação às demais características clínicas não houve diferença significativa conforme mostrado na tabela 6.

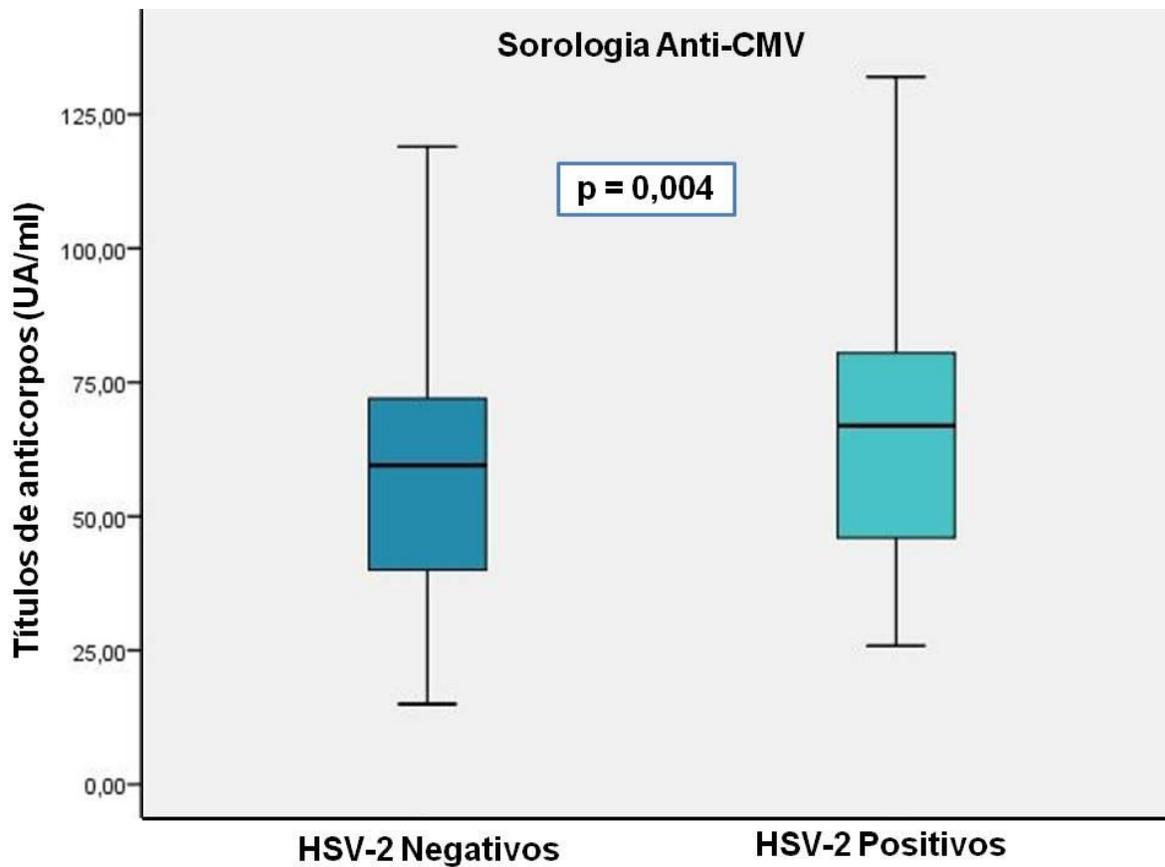


Figura 15. Diferença das concentrações de anticorpos anti-CMV nos pacientes HSV-2 positivos e dos HSV-2 Negativos

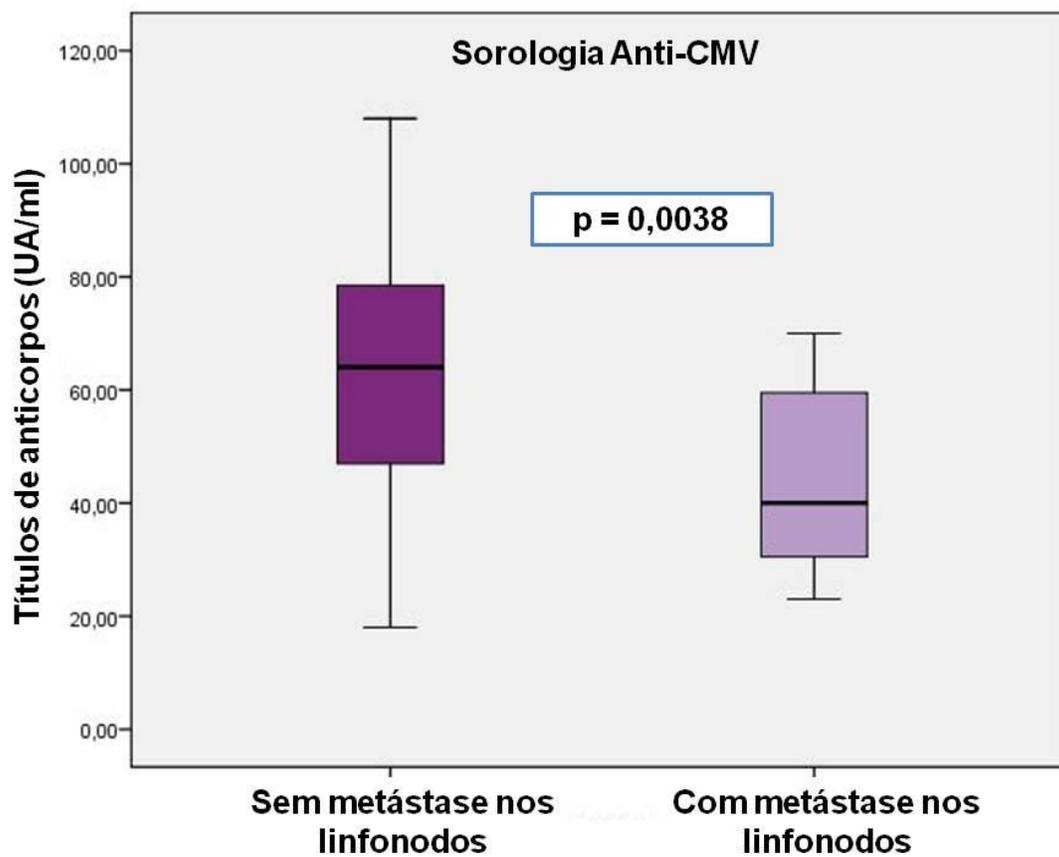


Figura 16. Diferença da quantidade de anticorpos anti-CMV presente nos pacientes que apresentaram metástase nos linfonodos ao diagnóstico versus pacientes sem metástase.

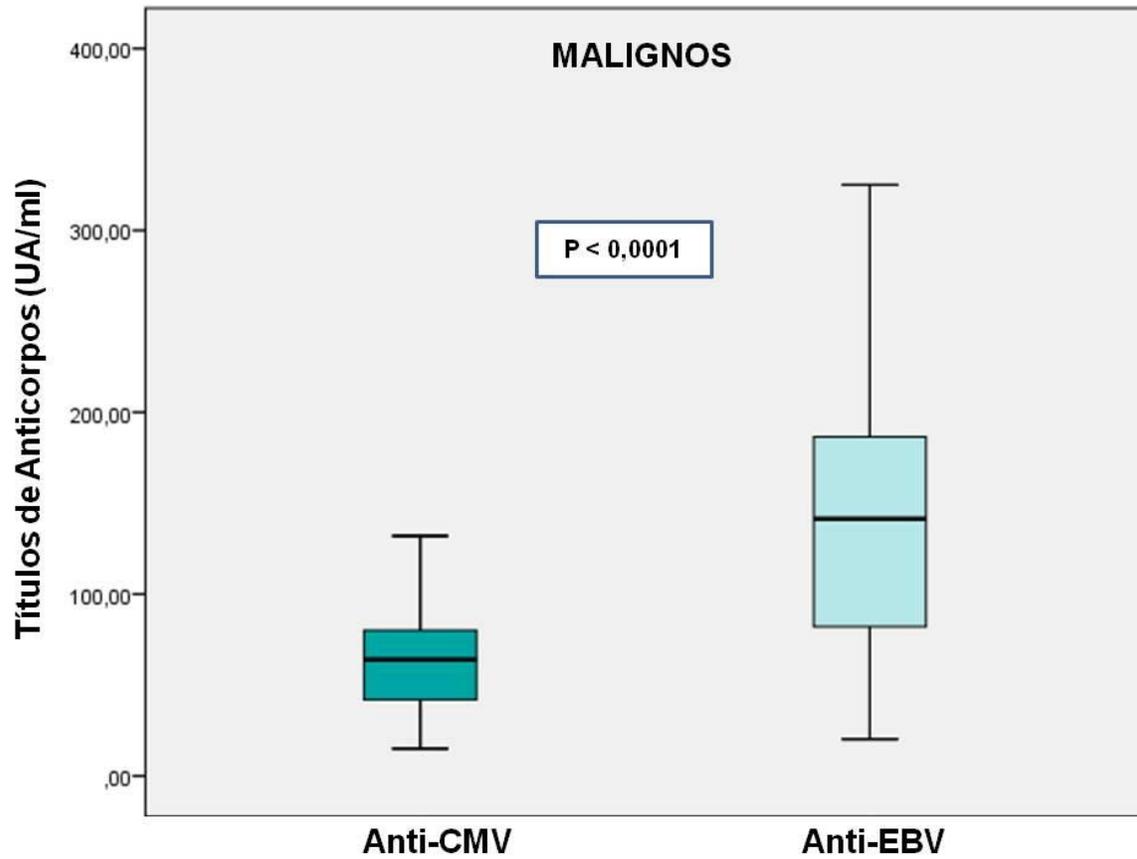


Figura 17. Diferença dos títulos de anticorpos anti-EBV e anti-CMV grupos de pacientes portadores de tumores malignos e benignos

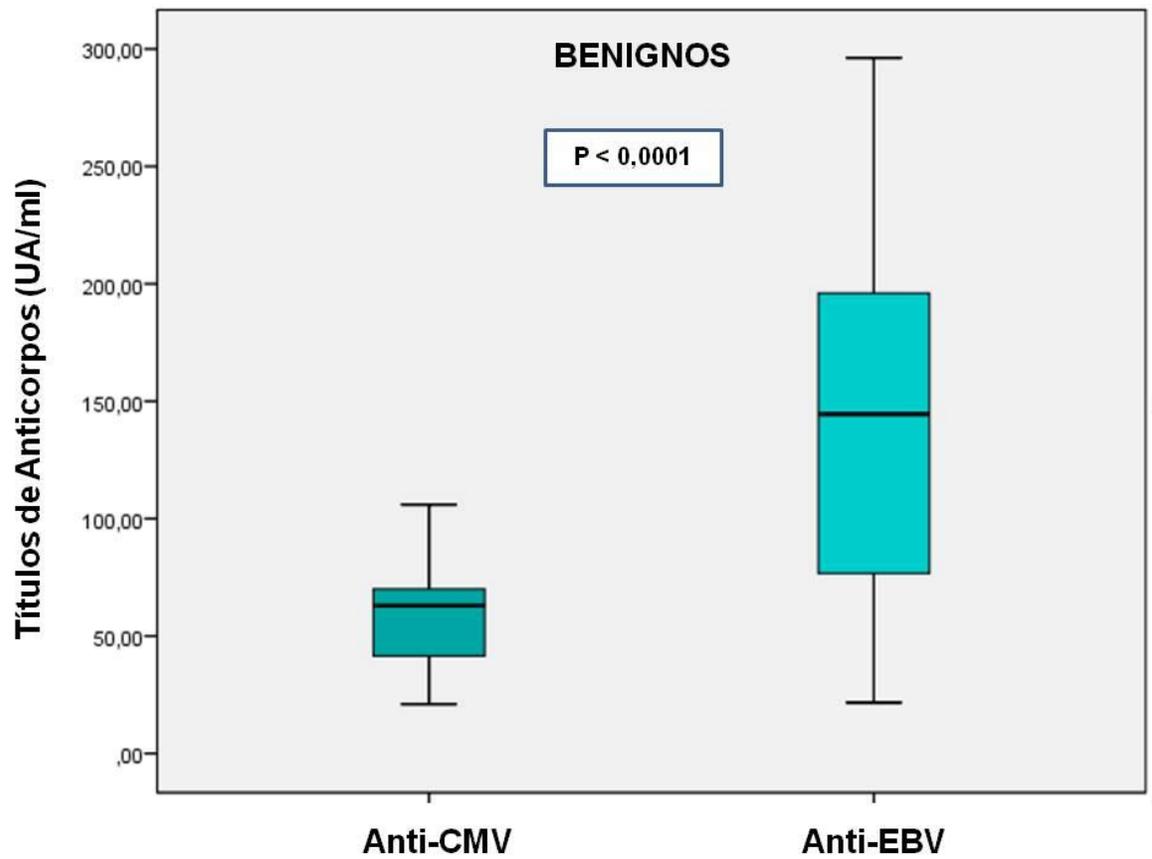


Figura 18. Diferença dos títulos de anticorpos anti-EBV e anti-CMV nos grupo de pacientes portadores de nódulos benignos.

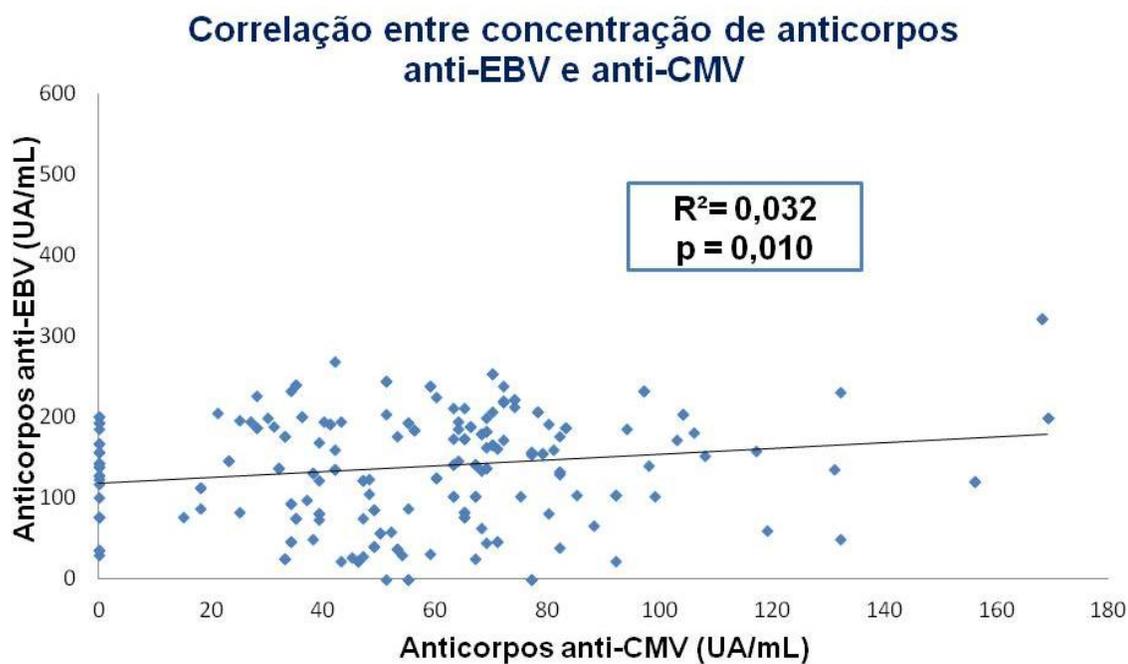


Figura 19. Gráfico de correlação de Pearson entre os títulos de anticorpos anti-EBV e anti-CMV

Tabela 6 - Análise estatística quantitativa (Mann-Whitney) dos resultados sorológicos de HSV-2, EBV e CMV.

Variável Clínica	Valor de p:		
	HSV-2	EBV	CMV
Gênero	NS*	NS	NS
Etnia	NS	NS	NS
Tabagismo	NS	NS	NS
Etilismo	NS	NS	NS
Antecedentes Familiares	NS	NS	NS

Multifocalidade	NS	NS	NS
Cápsula	NS	0,057 Presente x Ausente 108±71 x 150±71	NS
Extensão	NS	NS	NS
AcTg	NS	NS	NS
Metástase LN	NS	NS	0,0038 Presente x Ausente 44±18 x 67±33
Diagnóstico			
Infiltração	NS	NS	NS
Linfocítica			
Sorologia HSV-2	NS	NS	0,004 Presente x Ausente 64±24 x 57±40
Sorologia EBV	NS	NS	NS
Sorologia CMV	NS	NS	NS

*NS= Não Significativa

4.3 Análise Gênica: Carga Viral por PCR em Tempo Real Quantitativa

Nenhum dos casos analisados apresentou carga viral positiva para HSV-2 (0/85) e CMV (0/83), apesar da sorologia positiva em 29,4% e 83,7% respectivamente. O HHV-8 não foi analisado por não ter apresentado nenhum caso com sorologia positiva. No entanto, das 150 amostras com sorologia positivas analisadas para infecção por EBV, 20 (13,3%) amostras apresentaram carga viral positivas. Dentre as amostras EBV+, 13 eram de nódulos malignos (11 carcinomas papilíferos formas clássicas e 02 variantes foliculares); 4 eram bócios e 03 eram tireoidites de Hashimoto. As características dos pacientes com carga viral positiva foram resumidas na tabela 7.

Os tecidos malignos tiveram uma média de carga viral de 1068 ± 1318 cópias/ μg e os benignos com média de carga viral de 374 ± 300 cópias/ μg , no entanto não houve diferença estatística entre estes valores, como mostra a figura 20 ($p=0,1246$, Mann-Whitney). Foram encontrados também 6/75 (8%) casos positivos nos tecidos normais, entretanto a média da carga viral foi maior nos tumores (126 ± 487 cópias/ μg) do que em seus respectivos tecidos normais (93 ± 639 cópias/ μg ; $p=0,0207$ Wilcoxon) conforme ilustrado na figura 21.

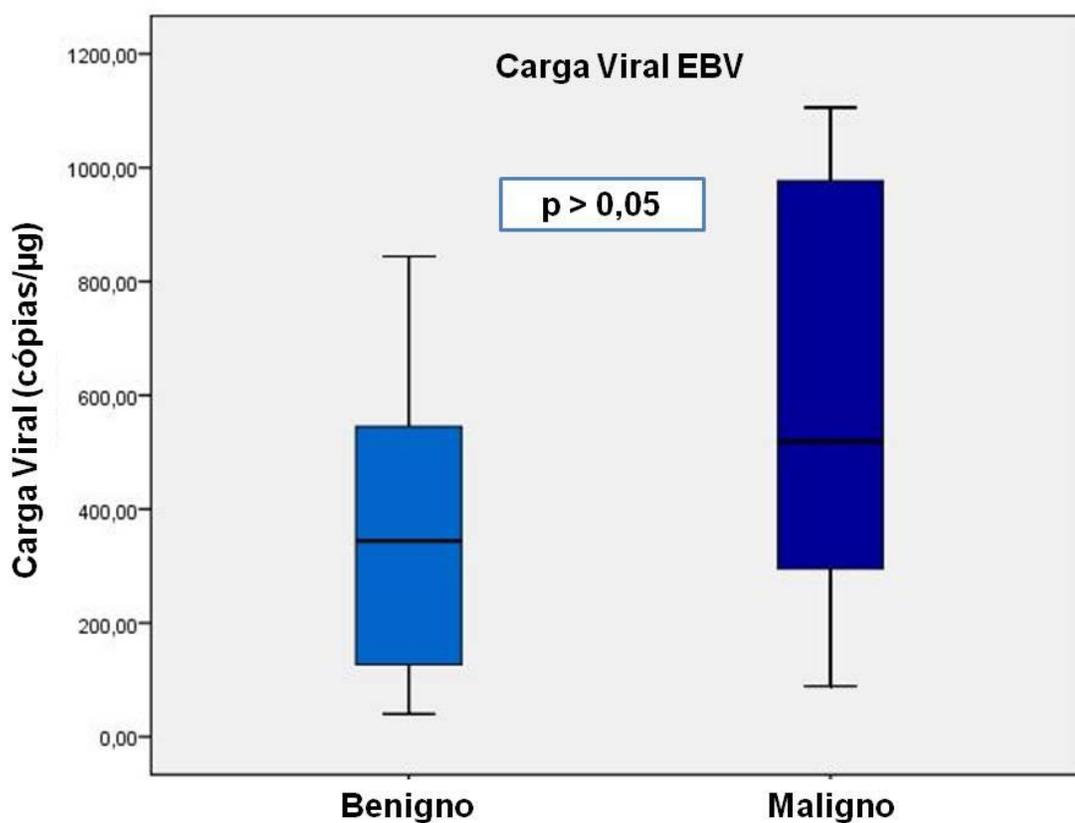


Figura 20. Carga Viral do EBV nos nódulos tireoidianos malignos e benignos.

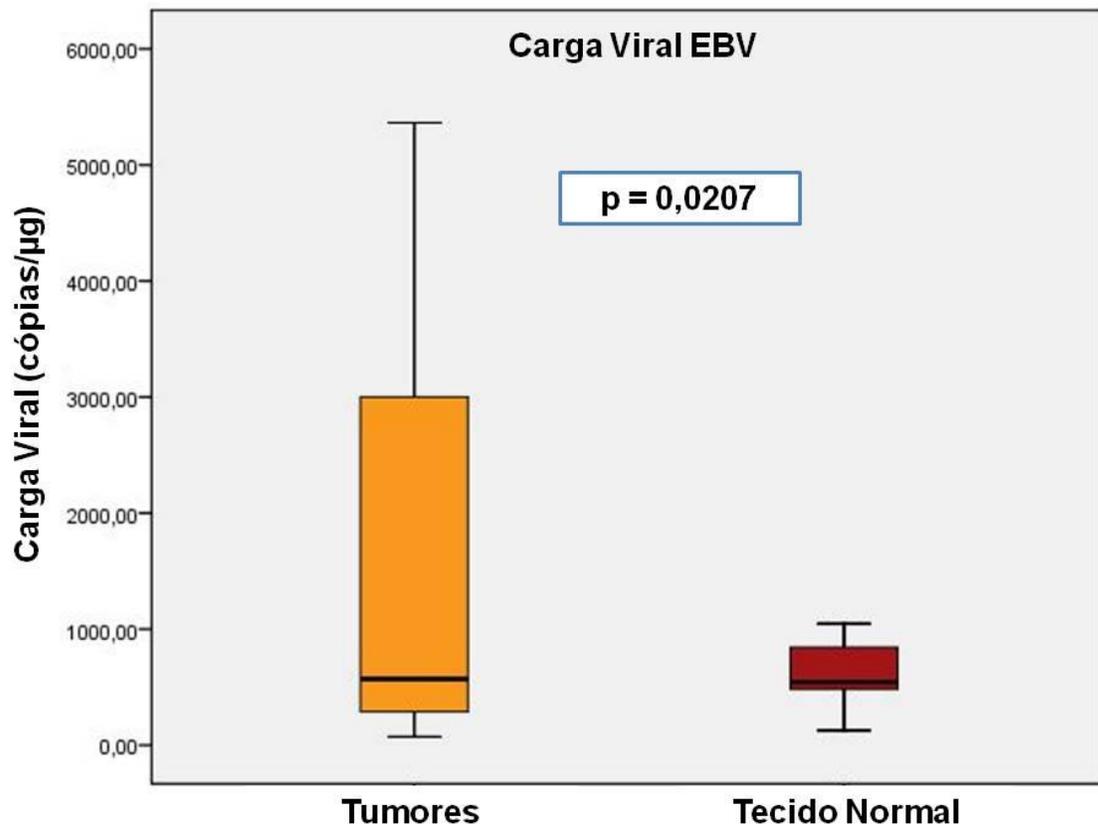


Figura 21. Carga Viral do EBV nos tumores e tecidos normais tireoidianos.

Tabela 7 - Descrição das características clínico-patológicas dos pacientes EBV Positivos nos tumores malignos e benignos de tireoide.

	Status	Carga Viral (cópias/ μ g)	Idade Diagn.	Histol.	Variante	Tamanho do Tumor	Infiltrado Linfocitário	Sorologia + Concomitante (Outros herpes vírus)
Caso 1	Benigno	844	63	Bócio	-	3 cm	Ausente	Ausente
Caso 2	Benigno	127	54	Bócio	-	-	Presente	CMV +
Caso 3	Benigno	40	30	TH*	-	-	Presente	CMV +
Caso 4	Benigno	2,26 x 10 ¹⁰	45	Bócio	-	0,9 cm	Ausente	CMV +/-HSV-2 +
Caso 5	Benigno	457	54	Bócio	-	7 cm	Presente	CMV +
Caso 6	Benigno	545	28	TH*	-	-	Presente	CMV+
Caso 7	Benigno	231	33	TH*	-	-	Presente	CMV +
Caso 8	Maligno	181	50	Papilífero	Clássica	0,8 cm	Ausente	CMV +
Caso 9	Maligno	484	41	Papilífero	Clássica	0,8 cm	-	CMV +
Caso 10	Maligno	1,903 x 10 ¹⁰	37	Papilífero	Folicular	2 cm	-	CMV +
Caso 11	Maligno	295	19	Micro Pap.	Clássica	0,9 cm	Presente	CMV +
Caso 12	Maligno	494	30	Micro Pap.	Clássica	0,5 cm	Presente	CMV +
Caso 13	Maligno	977	15	Papilífero	Clássica	2 cm	Presente	CMV +

Caso 14	Maligno	1047	32	Papilífero	Clássica	2 cm	Ausente	CMV +
Caso 15	Maligno	544	48	Papilífero	Clássica	1,3 cm	Presente	CMV +/HSV-2 +
Caso 16	Maligno	2024	37	Papilífero	Folicular	1,5 cm	Ausente	CMV +
Caso 17	Maligno	4910	48	Papilífero	Clássica	1,3 cm	-	CMV +
Caso 18	Maligno	88,65	49	Papilífero	Clássica	2 cm	Presente	CMV +
Caso 19	Maligno	669	54	Papilífero	Clássica	1,1 cm	Ausente	CMV +
Caso 20	Maligno	1105,5	73	Papilífero	Clássica	-	-	CMV +

***TH=Tireoidite de Hashimoto**

5.DISSCUSSÃO

Em relação a sorologia para os herpes vírus estudados, embora a frequência de anticorpos anti-HSV-2 e anti-EBV tenham sido ligeiramente maior nos pacientes com nódulos tireoidianos do que o esperado na população brasileira, a soroprevalência se mostrou similar e, portanto nossos dados apenas corroboraram os dados da literatura mundial (34, 85, 86).

A soroprevalência do HSV-2 na nossa amostra foi de 29,4%, maior do que a soroprevalência anteriormente descrita na população brasileira, de 11,3% (85). Notoriamente, há uma diferença significativa entre os pacientes portadores de nódulos tireoidianos (29,4%) e a população em geral (11,3%), No entanto, para comprovar tal diferença seria necessário estudar também a sorologia de indivíduos saudáveis sem histórico de nódulos tireoidianos como grupo controle, grupo o qual não dispusemos neste trabalho. Thomas e colaboradores (73) estudaram 34 crianças com DAIT e 31 crianças saudáveis como grupo controle e encontraram uma soroprevalência de cerca de 42% e 38% respectivamente, que se mostrou extremamente alta em relação à população brasileira. Este dado é um tanto surpreendente, em se tratando da infecção de um vírus transmitido sexualmente, já que foram estudadas crianças com idade de $9,62 \pm 2,35$ anos. Além deste trabalho, não houve outros estudos na literatura descrevendo a prevalência de HSV-2 em distúrbios tireoidianos na população mundial.

Em relação ao EBV, 98% de nossas amostras foram soropositivas, que foi próximo à expectativa de 95% descrita na população brasileira (34). Obtivemos 83,7% de soropositivos para infecção por CMV, o que também corrobora a literatura, pois estudos anteriores mostraram que 65% a 85% da população brasileira é infectada por este vírus (86).

Já para o HHV-8, no Brasil, a prevalência varia de 0 a 1,1,% da população saudável, atingindo taxas maiores no norte do país, especialmente na população indígena (59, 87). Nossos dados mostraram que nenhum indivíduo da população da região metropolitana de Campinas apresentou sorologia positiva para HHV-8.

Em relação aos achados da sorologia, não podemos afirmar de fato qual é a influência dos vírus sobre as características clínicas dos pacientes com nódulos tireoidianos, mas pelo fato de pacientes com metástase nos linfonodos ao diagnóstico terem menores quantidades de anticorpos anti-CMV, podemos assim criar uma hipótese de que a exposição a este vírus desencadeie uma resposta imunológica que é capaz de diminuir a possibilidade de uma metástase. No entanto, não há relatos na literatura que corroborem essa hipótese em outros tipos de cânceres. Pacientes portadores de nódulos não encapsulados apresentaram maiores quantidades de anticorpos anti-EBV, sugerindo que o EBV possa influenciar nessa característica de agressividade do tumor, uma vez que tumores não encapsulados apresentam comportamento mais agressivo que os não encapsulados (88). O EBV já foi apontado como causador de um pior prognóstico de pacientes com carcinoma de nasofaringe, por aumentar a capacidade de causar metástase à distância (18, 89). Assim, nossos dados parecem estar em consonância com a literatura.

Em relação aos resultados da PCR por carga viral, Jensen e colaboradores, em 2010, analisaram 109 tumores tireoidianos por PCR convencional, e encontraram 39,4% de prevalência do HSV-2 e HSV-1, associados a um aumento da expressão do receptor celular Nectina-1, que serve de porta de entrada para o vírus (23). Já as nossas 83 amostras de tecidos tireoidianos analisadas por PCR em tempo real não estavam infectada por HSV-2. Tsai e colaboradores realizaram um estudo em 2005 onde analisaram a presença de

diversos tipos de vírus em amostras de diversos tecidos tumorais, incluindo câncer de mama e tecido tireoidiano. Neste estudo foram analisadas 32 amostras de tecidos tireoidianos por PCR convencional, sendo encontrados 4 casos positivos (12,5%) para a infecção por CMV (21). No entanto, nossos dados não mostraram o mesmo, já que dentre as nossas 83 amostras analisadas nenhuma estava infectada. A diferença de nossos resultados com os acima citados pode se dever à menor sensibilidade que a PCR convencional tem em relação à PCR em tempo real por nós utilizada. Sendo assim, embora a PCR convencional tenha sido a metodologia mais utilizada e disponível na época dos estudos realizados (entre 2005 e 2008), é possível que os autores citados tenham registrado reações falso-positivas, as quais poderiam ter sido evitadas usando, no mínimo, uma PCR Nested, que é a metodologia mais utilizada em substituição à PCR convencional.

Thomas e colaboradores, em 2008, obtiveram 22 amostras de DNA de tecido tireoidiano provenientes de blocos de parafina, sendo 4 bócio e 18 pacientes com DAITs (Doença de Graves e Tireoidite de Hashimoto) e analisaram a presença dos herpes vírus HSV-1, HSV-2, CMV e HHV-6 e HHV-7 pela técnica de PCR convencional. Foram detectados DNA de HSV-1 e 2 em oito pacientes portadores de DAIT, porém, em nenhum paciente com bócio. O DNA de HHV-6 também foi detectado em 02 pacientes portadores de DAIT e em nenhum paciente com bócio. Já o HHV-7 foi encontrado em 07 DAITs e em 01 paciente com bócio. Não foi encontrada infecção por CMV nos tecidos analisados. Embora o DNA analisado tenha sido obtido a partir de blocos de parafina e o nosso DNA obtido de tecido fresco, nós analisamos dois herpes vírus em comum a este estudo (HSV-2 e CMV), e também não encontramos a presença deles nos tecidos malignos e benignos da tireoide (90).

Em outro estudo realizado em 2011 por um grupo de pesquisadores da Síria, com amostras de DNA de tecido fresco de 50 pacientes portadores de DAIT e 50 portadores de bócio como grupo controle, foi investigada, por PCR convencional, a presença dos herpes vírus HSV-1 e 2, VZV, EBV, CMV e HHV-6. Porém não foi encontrado nenhum tecido positivo para a infecção de nenhum dos herpes vírus estudados (91). Ao contrario, em nosso estudo, encontramos 03 casos de Tireoidite de Hashimoto infectados com o vírus EBV dentre os 20 pacientes EBV positivos. Não há relatos na literatura de trabalhos que tenham encontrado EBV em tecido de DAIT.

O HHV-8 não foi analisado neste estudo por PCR em tempo real para carga viral por não haver sorologia positiva nas nossas amostras, uma vez que partimos do princípio de que se não há anticorpos presentes no soro não houve apresentação de antígeno ao sistema imunológico, ou seja, não houve contato com o patógeno.

Já em relação a outros cânceres, um grupo de pesquisadores da China, em 2007, estudou a presença dos herpes vírus HSV-1, HSV-2, EBV, CMV, HHV-8 e HPV (92). Foram analisadas 62 amostras de tecido tumoral de pacientes com câncer de mama e 60 amostras de outros tipos de tecidos como grupo controle, sendo 16 amostras de tecido tumoral tireoidiano, 32 amostras de fibroadenoma e 12 amostras de tecido normal que foram analisados pela técnica de PCR convencional e por Southern blotting. Dentre os 62 pacientes com câncer de mama, foram encontrados oito (12,9%) casos positivos para HSV-1, 28 (45,2%) para EBV, 47 (75,8%) para CMV, oito (12,9%) para HPV e 28 (43,8%) para HHV-8, porém, nenhum caso estava infectado pelo HSV-2. Já dentre o grupo controle, 4/16 (25%) das amostras de tecido tumoral tireoidiano foram positivas para a infecção por CMV, e nas amostras de tecido de fibroadenoma foram encontrados 20/32 (62,5%) para HSV-1 e

16/32 (50%) para EBV, sendo que tecidos de fibroadenomas foram os únicos infectados pelo EBV. Em relação aos nossos casos, novamente, os resultados negativos para a infecção por CMV nos tecidos tireoidianos se mostraram diferentes da literatura, pois este trabalho chinês reforça a presença de sequências de DNA de CMV neste tipo de amostra. No entanto, ressaltamos novamente que a técnica utilizada foi a PCR convencional, que é menos sensível e específica do que a PCR em Tempo Real (92). E, em se tratando dos herpes vírus especificamente, é necessário ser cuidadoso na hora da escolha dos primers, pois muitas regiões do seu genoma são homólogas ou muito semelhantes a outras espécies de herpes vírus, aumentando assim as chances de reações falso positivas.

Embora seja estabelecido que o EBV, por pertencer ao gênero *Lymphocryptovirus*, possui tropismo por linfócitos B, não conhecemos o mecanismo pelo qual foi possível que este vírus tenha infectado a glândula tireoidiana, já que este é o primeiro estudo da literatura que revelou este achado. No entanto há estudos recentes que mostram que uma cepa do vírus pouco comum no mundo, chamada M81, possui tropismo por células epiteliais (93, 94).

Diversos vírus ao longo dos últimos anos têm sido relacionados com diversos tipos de cânceres, e medidas profiláticas têm sido sugeridas. Inclusive em um artigo de revisão de Zhang e colaboradores citou o EBV dentre outros vírus oncogênicos como HPV, HBV, HCV, HHV-8 e HTLV onde os autores concluem que ações como vacinação profilática contra vírus oncogênicos possam ser eficazes na diminuição da incidência do câncer, porém são necessários mais estudos que comprovem os mecanismos moleculares destes vírus *in vivo* fornecendo, assim, maiores ferramentas de estudos para prevenção ou terapia dos cânceres causados por esses vírus (95).

6. CONCLUSÃO

Embora, para melhor compreensão de seus mecanismos de ação, sejam necessários novos estudos moleculares e microbiológicos, a presença da alta carga viral do EBV nos tecidos tumorais tireoidianos em relação aos tecidos normais correspondentes sugere que este vírus pode exercer um papel no desenvolvimento de nódulos tireoidianos.

Com base neste trabalho abre-se uma nova possibilidade de estudos para analisar a real relação do EBV com o desenvolvimento de neoplasias tireoidianas.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014 2013 [cited 2013]. Available from: www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agenianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014.
2. Davies L, Welch HG. Current Thyroid Cancer Trends in the United States. *JAMA otolaryngology-- head & neck surgery*. 2014.
3. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, Ribeiro MG, Sieiro AP, Vaisman M. [Incidence and mortality from thyroid cancer in Brazil]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2005;49(4):503-9.
4. WHO. Cancer incidence. Mortality and Prevalence Worldwide: World Health Organization and International Agency for Research on Cancer; 2000 [20/09/2011]. Available from: <http://www.depdb.iarc.fr/globocan/GLOBOframe.htm>.
5. Ward LS. Bases moleculares para o diagnóstico e terapêutica do câncer da tireoide. Lopes A, editor. Rio de Janeiro MEDSI Editora Médica e Científica; 2002. 6 p.
6. Li N, Du XL, Reitzel LR, Xu L, Sturgis EM. Impact of enhanced detection on the increase in thyroid cancer incidence in the United States: review of incidence trends by socioeconomic status within the surveillance, epidemiology, and end results registry, 1980-2008. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2013;23(1):103-10.
7. Hayashi Y, Lagarde F, Tsuda N, Funamoto S, Preston DL, Koyama K, et al. Papillary microcarcinoma of the thyroid among atomic bomb survivors: tumor characteristics and radiation risk. *Cancer*. 2010;116(7):1646-55.
8. Ward LS, Brenta G, Medvedovic M, Fagin JA. Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(2):525-30.
9. Wartofsky L. Increasing world incidence of thyroid cancer: increased detection or higher radiation exposure? *Hormones*. 2010;9(2):103-8.
10. Knobel M, Medeiros-Neto G. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2007;51(5):701-12.
11. Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, van Hasselt CA. Iodine mediated mechanisms and thyroid carcinoma. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2009;46(5-6):302-18.
12. Pellegriti G, De Vathaire F, Scollo C, Attard M, Giordano C, Arena S, et al. Papillary thyroid cancer incidence in the volcanic area of Sicily. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(22):1575-83.
13. IARC. Causes of Cancer in General 2003. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/wcr-2.pdf>.
14. Rous P. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med*. 1911;13(4):397-411.
15. Eddy BE, Stewart SE, Berkeley W. Cytopathogenicity in tissue culture by a tumor virus from mice. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1958;98(4):848-51.
16. Sell S. Infection, stem cells and cancer signals. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011;12(2):182-8.
17. Lee HL, Essani K. Differential susceptibility of human cancer cell lines to wild-type tanapoxvirus infection. *Open Virol J*. 2010;4:1-6.

18. Li G, Wu Z, Peng Y, Liu X, Lu J, Wang L, et al. MicroRNA-10b induced by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 promotes the metastasis of human nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer letters*. 2010;299(1):29-36.
19. Lowy DR, Solomon D, Hildesheim A, Schiller JT, Schiffman M. Human papillomavirus infection and the primary and secondary prevention of cervical cancer. *Cancer*. 2008;113(7 Suppl):1980-93.
20. Piazeulo MB, Epplein M, Correa P. Gastric cancer: an infectious disease. *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24(4):853-69, vii.
21. Tsai JH, Tsai CH, Cheng MH, Lin SJ, Xu FL, Yang CC. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J Med Virol*. 2005;75(2):276-81.
22. Noch E, Khalili K. Oncogenic viruses and tumor glucose metabolism: like kids in a candy store. *Molecular cancer therapeutics*. 2012;11(1):14-23.
23. Jensen K, Patel A, Larin A, Hoperia V, Saji M, Bauer A, et al. Human herpes simplex viruses in benign and malignant thyroid tumours. *J Pathol*. 2010;221(2):193-200.
24. Giaginis C, Zarros A, Alexandrou P, Klijanienko J, Delladetsima I, Theocharis S. Evaluation of coxsackievirus and adenovirus receptor expression in human benign and malignant thyroid lesions. *APMIS*. 2010;118(3):210-21.
25. Arvin A. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: University Press; 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47403/#c04unf-17r-mk4-mn7>.
26. Dimmock NJ. *Introduction to modern virology*. Malden: Blackwell Publishing; 2007.
27. Krummenacher C, Baribaud I, Sanzo JF, Cohen GH, Eisenberg RJ. Effects of herpes simplex virus on structure and function of nectin-1/HveC. *J Virol*. 2002;76(5):2424-33.
28. Jensen K. HSV-2 Infection Targets Thyroid Gland and Affects Expression of DNA Repair Molecules in Thyroid Cells Boston: *Endocrine Reviews*; 2011 [cited 32]. Available from: http://edrv.endojournals.org/cgi/content/meeting_abstract/32/03_MeetingAbstracts/P2-681?sid=b524cc12-2658-4b7e-ba4d-ba811c50a732.
29. IARC W. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 1997* [05/12/2011]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/>.
30. Henle W, Henle G. The relation between the Epstein-Barr virus and infectious mononucleosis, Burkitt's lymphoma and cancer of the postnasal space. *East Afr Med J*. 1969;46(7):402-6.
31. Barros MH, Scheliga A, De Matteo E, Minnicelli C, Soares FA, Zalcberg IR, et al. Cell cycle characteristics and Epstein-Barr virus are differentially associated with aggressive and non-aggressive subsets of Hodgkin lymphoma in pediatric patients. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(8):1513-22.
32. Rickinson A. Concluding overview: looking back, looking forward. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;356(1408):595-604.
33. Hjalgrim H. *The epidemiology of EBV and its association with malignant disease*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007.

34. Hadinoto V, Shapiro M, Greenough TC, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. *Blood*. 2008;111(3):1420-7.
35. Li XP, Li G, Peng Y, Kung HF, Lin MC. Suppression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by RNA interference inhibits the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(1):212-8.
36. Tsao SW, Tramoutanis G, Dawson CW, Lo AK, Huang DP. The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2002;12(6):473-87.
37. Chen PC, Pan CC, Hsu WH, Ka HJ, Yang AH. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelioma-like carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol*. 2003;34(4):407-11.
38. Cordes C, Tiemann M, Tiemann K, Knappe D, Hoffmann M, Gottschlich S. Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma of the hypopharynx. *B-ENT*. 2011;7(1):43-6.
39. Goodpasture E, Talbor FB Concernig the nature of iportozoan-like cells in certain lesions of infancy. *Am J Dis Child* 1921;21:10.
40. Farber S, Wolbach SB. Intranuclear and Cytoplasmic Inclusions ("Protozoan-Like Bodies") in the Salivary Glands and Other Organs of Infants. *The American journal of pathology*. 1932;8(2):123-36 3.
41. Rowe WP, Hartley JW, Waterman S, Turner HC, Huebner RJ. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;92(2):418-24.
42. Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956;92(2):424-30.
43. Weller H MJC, Craig J M, Wirth P. . Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. . *Proc Soc Exp Biol Med* 1957;94:8.
44. Rasmussen L. Immune response to human cytomegalovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990;154:221-54.
45. Junqueira JJM ST, Santos VA Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. *News Lab*. 2008(86):10.
46. Houry EL, Pereira L, Greenspan FS. Induction of HLA-DR expression on thyroid follicular cells by cytomegalovirus infection in vitro. Evidence for a dual mechanism of induction. *The American journal of pathology*. 1991;138(5):1209-23.
47. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994;266(5192):1865-9.
48. Dupin NM, A-G.; Gorin, I.; Bossi, P.; Franck, N.; Weill, B.; Huraux, J.M.; Escande, J-P.; Calvez, V. Prevalence of human herpesvirus 8 infection measured by antibodies to a latent nuclear antigen in patients with various dermatologic diseases. *Arch Dermatol*. 1999;134:3.
49. Bubman D, Cesarman E. Pathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2003;17(3):717-45.
50. Blackburn DJO, D.; Levy, J.A.; Lennette, E. T. Increased human herpesvirus 8 soroprevalence in young homosexual men who have multiple sex contacts with different partners. *J Infect Dis*. 1997;179:3.

51. Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, et al. Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells. *J Exp Med.* 1996;183(5):2385-90.
52. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA, Lukac DM. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(2):175-212, table of contents.
53. Geraminejad P, Memar O, Aronson I, Rady PL, Hengge U, Tyring SK. Kaposi's sarcoma and other manifestations of human herpesvirus 8. *J Am Acad Dermatol.* 2002;47(5):641-55; quiz 56-8.
54. Lee H, Veazey R, Williams K, Li M, Guo J, Neipel F, et al. Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med.* 1998;4(4):435-40.
55. Nascimento MC, Wilder N, Pannuti CS, Weiss HA, Mayaud P. Molecular characterization of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) from patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma in Sao Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2005;33(1):52-9.
56. Nicholas J, Zong JC, Alcendor DJ, Ciufo DM, Poole LJ, Sarisky RT, et al. Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1998(23):79-88.
57. Nascimento MC. Distribuição dos subtipos de herpesvírus8 humano em pacientes com AIDS e sarcoma de Kaposi em São Paulo. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2003.
58. Zhang T HN, Ding Y, Crabtree K, Minhas V, Wood C. . Prevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) and hepatitis C virus (HCV) in a rural community with high risk for blood borne infections in central China. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010.
59. Souza VA, Salzano FM, Petzl-Erlar ML, Nascimento MC, Mayaud P, Borges JD, et al. Variations in human herpesvirus type 8 seroprevalence in Native Americans, South America. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):1003-6.
60. Pica F, Volpi A. Transmission of human herpesvirus 8: an update. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(2):152-6.
61. Dedicoat M, Newton R, Alkharsah KR, Sheldon J, Szabados I, Ndlovu B, et al. Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. *J Infect Dis.* 2004;190(6):1068-75.
62. Kouri V, Martinez PA, Blanco O, Capo V, Rodriguez ME, Dovigny Mdel C, et al. Simultaneous quantification of human herpesvirus 8 DNA by real time PCR in different tissues of HIV infected cuban patients with Kaposi's sarcoma. *Herpesviridae.* 2010;1(1):3.
63. Hengee UR RT, Tyring SK, Seeber, S Update on Kaposi's sarcoma and other associated diseases. Part. 1: epidemiology, environmental, predispositions, and therapy. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:11.
64. Renne R, Lagunoff M, Zhong W, Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol.* 1996;70(11):8151-4.
65. Krueger GRF, Ablashi DV. Human herpesvirus-6 : general virology, epidemiology, and clinical pathology. 2nd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier; 2006. p. p.
66. Schulz TF, Moore PS. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a new human tumor virus, but how? *Trends Microbiol.* 1999;7(5):196-200.

67. Hardie DR. Human gamma-herpesviruses: a review of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus Apher Sci.* 2010;42(2):177-83.
68. Cai QL, Knight JS, Verma SC, Zald P, Robertson ES. EC5S ubiquitin complex is recruited by KSHV latent antigen LANA for degradation of the VHL and p53 tumor suppressors. *PLoS Pathog.* 2006;2(10):e116.
69. Zaldumbide A, Ossevoort M, Wiertz EJ, Hoeben RC. In cis inhibition of antigen processing by the latency-associated nuclear antigen I of Kaposi sarcoma herpes virus. *Mol Immunol.* 2007;44(6):1352-60.
70. Dupin N, Diss TL, Kellam P, Tulliez M, Du MQ, Sicard D, et al. HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood.* 2000;95(4):1406-12.
71. Leite JL, Bufalo NE, Santos RB, Romaldini JH, Ward LS. Herpesvirus type 7 infection may play an important role in individuals with a genetic profile of susceptibility to Graves' disease. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(2):315-21.
72. Leite JL, Manfrinatto JA, Mazzali M, Ward LS. Polymorphisms at exon 4 of p53 and the susceptibility to herpesvirus types 6 and 1 infection in renal transplant recipients. *Transpl Int.* 2006;19(9):732-7.
73. Thomas D, Karachaliou F, Kallergi K, Vlachopapadopoulou E, Antonaki G, Chatzimarkou F, et al. Herpes virus antibodies seroprevalence in children with autoimmune thyroid disease. *Endocrine.* 2008;33(2):171-5.
74. Nagata K, Fukata S, Kanai K, Satoh Y, Segawa T, Kuwamoto S, et al. The influence of Epstein-Barr virus reactivation in patients with Graves' disease. *Viral Immunol.* 2011;24(2):143-9.
75. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. 6th ed 2002.
76. Marcello MAC AC, L.L.; Vasquez, A.C.J.; Assumpção, L.V.M.; Geloneze, B.; Ward, L.S. Adiponectin but not leptin may be involved in differentiated thyroid cancer development. In: Journal L, editor. Latin American Thyroid Society; Lima, Peru: AC Farmaceutica; 2011.
77. Aryee EA, Bailey RL, Natividad-Sancho A, Kaye S, Holland MJ. Detection, quantification and genotyping of Herpes Simplex Virus in cervicovaginal secretions by real-time PCR: a cross sectional survey. *Virol J.* 2005;2:61.
78. Gault E, Michel Y, Dehee A, Belabani C, Nicolas JC, Garbarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):772-5.
79. Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, Lastere S, Bellet D, Bourhis JH. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39(12):4362-9.
80. Kim do N, Seo MK, Choi H, Kim SY, Shin HJ, Yoon AR, et al. Characterization of naturally Epstein-Barr virus-infected gastric carcinoma cell line YCCEL1. *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 3):497-506.
81. Ryan JL, Fan H, Glaser SL, Schichman SA, Raab-Traub N, Gulley ML. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *J Mol Diagn.* 2004;6(4):378-85.
82. Yamamoto T, Yamada A, Tsuji K, Iwatsuki K. Tracing of the molecular remnants of herpes virus infections in necrotic skin tissue. *Eur J Dermatol.* 2008;18(5):499-503.

83. Rowe DT, Webber S, Schauer EM, Reyes J, Green M. Epstein-Barr virus load monitoring: its role in the prevention and management of post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis.* 2001;3(2):79-87.
84. Weinstock DM, Ambrossi GG, Brennan C, Kiehn TE, Jakubowski A. Preemptive diagnosis and treatment of Epstein-Barr virus-associated post transplant lymphoproliferative disorder after hematopoietic stem cell transplant: an approach in development. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37(6):539-46.
85. Clemens SA, Farhat CK. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2010;44(4):726-34.
86. Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010;43(4):359-61.
87. Caterino-De-Araujo A, de los Santos-Fortuna E, Carbone PH, Cibella SE, Moreira AA. Human herpesvirus-8 (HHV-8) antibodies in women from Sao Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Braz J Infect Dis.* 2003;7(6):395-401.
88. Rosario PW, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, et al. Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia.* 2013;57(4):240-64.
89. Chen CC, Liu HP, Chao M, Liang Y, Tsang NM, Huang HY, et al. NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of TNFAIP2 by the Epstein-Barr virus oncoprotein, LMP1, promotes cell motility in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene.* 2013.
90. Thomas D, Liakos V, Michou V, Kapranos N, Kaltsas G, Tsilivakos V, et al. Detection of herpes virus DNA in post-operative thyroid tissue specimens of patients with autoimmune thyroid disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116(1):35-9.
91. N AL-Z, Monem F. Are human herpes viruses associated with autoimmune thyroid disease? *J Infect Dev Ctries.* 2011;5(12):890-2.
92. Tsai JH, Hsu CS, Tsai CH, Su JM, Liu YT, Cheng MH, et al. Relationship between viral factors, axillary lymph node status and survival in breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2007;133(1):13-21.
93. Frappier L. A cancer-associated Epstein-Barr virus variant with epithelial tropism. *Trends Microbiol.* 2013;21(12):616-7.
94. Tsai M-H. Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Press.* 2013.
95. Zhang X, Zhang Z, Zheng B, He Z, Winberg G, Ernberg I. An update on viral association of human cancers. *Arch Virol.* 2013;158(7):1433-43.