

Monografia de Conclusão de Curso

**“Carcinoma de células de Merckel humano e sua potencial
associação com o recém-descrito poliomavírus MCPyV:
avaliação preliminar de biopsias e análise de casualidade”**

**Danielle Amorim
Acadêmica**

**Deilson Elgui de Oliveira
Orientador**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências – UNESP Botucatu, SP –
como exigência parcial para a obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biológicas – Modalidade Médica.

**Botucatu. SP
Julho de 2008**

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

**“Carcinoma de células de Merckel humano e sua potencial
associação com o recém-descrito poliomavírus MCPyV:
avaliação preliminar de biopsias e análise de casualidade”**

DANIELLE AMORIM

Acadêmica

DEILSON ELGUI DE OLIVEIRA

Orientador

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências – UNESP Botucatu, SP –
como exigência parcial para a obtenção
do título de Bacharel em Ciências
Biológicas – Modalidade Médica.

Botucatu, SP

Julho de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Amorim, Danielle.

Carcinoma de células de Merckel humano e sua potencial associação com o recém-descrito poliomavírus MCPyV: avaliação preliminar de biopsias e análise de casualidade / Danielle Amorim. - Botucatu [s.n], 2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade médica) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Deilson Elgui de Oliveira

1. Carcinoma 2. Carcinogênese 3. Vírus

Palavras-chave: Carcinogênese; Carcinoma de células de Merkel; Critérios de casualidade; MCPyV; Poliomavírus

Índice

1	RESUMO	5
2	INTRODUÇÃO	6
2.1	Cânceres cutâneos e o carcinoma de células de Merckel	6
2.2	Crítérios de casualidade e etiologia viral de cânceres humanos	10
2.3	Poliomavírus humanos	17
2.4	CCM e sua possível relação com um novo poliomavírus	19
3	OBJETIVOS.....	22
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	23
4.1	Seleção das amostras	23
4.2	Extração de DNA de tecido incluído em parafina	23
4.3	Pesquisa do MCPyV	24
5	RESULTADOS	26
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÕES	36
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 Resumo

Neoplasias malignas da pele são os cânceres mais comuns da espécie humana. No entanto há tipos raros como o Carcinoma de células de Merkel (CCM), cuja incidência tem aumentado em todo mundo. O CCM possui curso agressivo, com freqüente envolvimento de nódulos linfáticos regionais e metástases à distância. Adicionalmente, afeta predominantemente idosos e imunocomprometidos, fato que levou-se a suspeita de uma possível etiologia infecciosa para essa neoplasia. Nesse foi-se isolado e descrito o MCPyV, um novo poliomavirus humano, diretamente de células tumorais do CCM. O objetivo do presente trabalho é dar continuidade à pesquisa desse novo vírus apresentando dados iniciais da pesquisa do MCPyV em número significativo de casos de CCM de pacientes brasileiros. Para tanto, foram analisadas 24 biópsias de CCM fixadas e incluídas em parafina, das quais foram extraído o material genômico e o produto submetido à PCR convencional com três pares de iniciadores descritos pela literatura (LT1, LT3 e VP1), com a finalidade de se detectar segmentos do vírus. No presente estudo o genoma viral foi detectado em 11/24 (45,8%) das amostras avaliadas, sendo que a positividade para cada par de iniciadores foi de 4/24 (16,7%) para LT1, 11/24 (45,8%) para LT3 e 4/24 (16,7%) para VP1. Essas freqüências são menores do que a relatada pela literatura e essa diferença pode ser devida a diferença nas amostras analisadas e nas técnicas empregadas. Outros estudos são necessários para comprovar a relação de causalidade, assim como desvendar o ciclo do MCPyV.

2 Introdução

2.1 Cânceres cutâneos e o carcinoma de células de Merckel

Neoplasias malignas da pele são os cânceres mais comuns na espécie humana. Por outro lado, são curáveis em 90% dos casos quando diagnosticado precocemente¹. Tradicionalmente os cânceres de pele são divididos em melanomas e não-melanoma.

O melanoma cutâneo tem origem em células precursoras de melanócitos e ocorrem mais freqüentemente em indivíduos adultos brancos. Embora represente apenas 4% dos casos de câncer de pele, a doença exibe elevada agressividade biológica, explicitada pelo alto potencial de metástase quando as lesões não são diagnosticadas precocemente². Em todo mundo, a sobrevida média em 5 anos para pacientes com melanoma é estimada em 69%, oscilando de 73% nos países desenvolvidos até 56% nos países em desenvolvimento³. Em 2002 foram relatados cerca de 160.000 novos casos da doença, e aproximadamente 22.000 óbitos foram atribuídos ao melanoma³. No Brasil, estimativas para 2008 apontam cerca de 5.900 novos casos¹. Dentre os principais fatores de risco descritos para o melanoma estão pele clara (baixo fototipo), exposição excessiva ao sol, histórico familiar de câncer de pele e idade, pois a propensão para este tipo de câncer aumenta após os 15 anos de idade.

Cânceres de pele não-melanomas são as neoplasias malignas cutâneas mais freqüentes - cerca de 95% dos casos. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer do Brasil¹, estima-se que em 2008 o número de casos novos de cânceres de pele não-melanoma no país supere os 115.000 (55.890 homens e 59.120

mulheres). Esses números englobam duas entidades histopatológicas principais: o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular. Carcinomas basocelulares são originários da epiderme e dos apêndices cutâneos acima da camada basal; carcinomas espinocelulares, por outro lado, têm origem em células programadas para diferenciação em queratinócitos da epiderme. Assim como os melanomas, os cânceres de pele não-melanoma também estão relacionados à exposição excessiva ao sol, mas outros fatores de risco também são cogitados, incluindo exposições a determinadas substâncias químicas (e.g., arsênico e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e outros tipos de radiações.⁴.

Dentre as neoplasias malignas cutâneas que acometem humanos também são descritas algumas doenças raras, como o Sarcoma de Kaposi (SK) e o Carcinoma de células de Merkel (CCM). O SK é uma neoplasia maligna com origem em células precursoras endoteliais, cuja manifestação mais frequente é o desenvolvimento de lesões cutâneas violáceas. Em parcela dos casos pode haver envolvimento de mucosas, sistema linfático e vísceras⁵. Atualmente são reconhecidas quatro formas clínico-epidemiológicas do SK: o SK clássico, que acomete homens idosos em países mediterrâneos; o SK iatrogênico, associado à imunossupressão de pacientes transplantados ou que passaram por tratamento prolongado com corticóides; a forma endêmica-africana, que é agressiva e atinge crianças na África Sub-Saariana; e a forma associada à Aids, que se manifesta em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV)⁶. Evidências acumuladas nas últimas décadas revelaram associação do SK com a infecção por um novo herpesvírus humano

descrito em 1994, denominado herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (*Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus* – KSHV), ou herpesvirus humano tipo 8 (*Human Herpesvirus type 8* - HHV-8)⁷. O genoma viral é detectado nas células neoplásicas de todos os casos de SK e a associação causal com a doença é fortalecida pela descrição de propriedades oncogênicas de diversos produtos do KSHV/HHV-8 que interferem no controle da proliferação celular, na apoptose e na eficiência da resposta imunológica do hospedeiro, dentre outras atividades^{8, 9}.

De maneira semelhante ao SK, o CCM é uma neoplasia maligna que afeta predominantemente indivíduos idosos e imunocomprometidos. Entretanto, caracteristicamente tem curso agressivo, com freqüente envolvimento de nódulos linfáticos regionais e metástases à distância, além de elevada taxa de recorrência e potencial propagação pelo sistema linfático, com o desenvolvimento de múltiplas lesões satélites¹⁰. Células neoplásicas do CCM compartilham com as células de Merkel normais características morfológicas, imunoistoquímicas e ultra-estruturais. Porém, não há evidências conclusivas de que o CCM derive das células de Merkel ou de seus precursores³. Células de Merkel foram descritas por Fredrick Merkel em 1875 e atuam como mecanorreceptores da camada basal da epiderme, contribuindo para a percepção do estímulo tátil e fornecendo ao sistema nervoso central (SNC) informações sobre o movimento capilar. Têm origem neuroendócrina e migram da crista neural para a pele, onde se diferenciam em células maduras¹¹.

O CCM se desenvolve principalmente na pele exposta ao sol na forma de lesões de diâmetro geralmente inferior a 2 cm. Em 50% dos casos a cabeça e o

pescoço são as principais regiões afetadas; extremidades aparecem em segundo lugar, com 40% dos casos, e tronco e genitália em menos de 10% dos casos.^{3,10} Os tumores são indolores, em forma de cúpula ou placa endurecida, com coloração vermelha a azulada/violeta ou sem pigmentação distintiva. a neoplasia tende a exibir crescimento rápido, de semanas a meses, e em alguns casos são observadas lesões ulceradas³.

Na maioria dos pacientes com CCM a doença diagnosticada ainda é localizada (70% a 80% dos casos). O comprometimento de nódulos linfáticos regionais é observado em 9% a 26% dos casos, enquanto 1% a 4% dos casos já apresentam metástases à distância ao diagnóstico. A taxa de recorrência é de 27% a 60% após excisão do tumor localizado, 45% a 91% no caso de pacientes com metástase em nódulos linfáticos regionais e de 18% a 52% nos casos de metástase à distância. Geralmente a recorrência ocorre em até 2 anos após o diagnóstico e a maioria dos pacientes morre com o comprometimento neoplásico de órgãos como fígado, ossos, pulmão e SNC.¹⁰

Conforme previamente mencionado, o CCM é raro comparado a outras neoplasias malignas de pele, como o carcinoma de células basais e o carcinoma de células escamosas. De acordo com o programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (*Surveillance, Epidemiology and End-Results* - SEER) de cânceres dos Estados Unidos da América (EUA), a incidência de CCM entre homens e mulheres é de 0,34/100.000 e 0,17/ 100.000, respectivamente. A grande maioria dos pacientes (94%) têm idade superior a 69 anos e são brancos. Pacientes imunocomprometidos, portadores do HIV ou que sofrem de leucemia

linfocítica crônica, apresentam maior risco de apresentarem o CCM e são mais propensos a falha terapêutica¹².

Desde a descrição do CCM por Toker, em 1972¹³, a etiologia da doença é debatida, mas essencialmente ignorada. Tendo em vista que as lesões aparecem principalmente nas regiões expostas ao sol, acredita-se que a radiação ultravioleta solar tenha participação no desenvolvimento da neoplasia maligna, à semelhança de outros cânceres cutâneos. De fato, um estudo publicado em 1999 sobre as semelhanças e diferenças entre o CCM e o melanoma revela que a incidência para ambas as neoplasias aumenta proporcionalmente com a exposição ao sol, medida com base nos raios UVB¹⁴. Também são fatores de risco cogitados para o desenvolvimento do CCM a exposição ao arsênio e tratamentos com raios UVA ou com o metoxaleno (droga utilizada para tratar psoríase, eczemas e alguns linfomas cutâneos. Sinônimos: 8-metoxipsoraleno, amoidina e xantotoxina).¹¹ Recentemente, a descrição do genoma viral de um novo poliomavírus em células do CCM oferece novo horizonte para o entendimento da etiopatogenia da doença¹⁵. Entretanto, o estabelecimento de relação causal entre infecção viral e neoplasias malignas não é tarefa trivial, conforme será apresentado a seguir.

2.2 Critérios de casualidade e etiologia viral de cânceres humanos

Com o advento do microscópio, estruturas biológicas e microrganismos até então desconhecidos foram descritos e suas atividades estudadas. Durante o século XIX, pesquisadores munidos de persistência, perspicácia e microscópios contribuíram substancialmente para a elucidação dos mecanismos das doenças humanas. Como ícone desse período, pode ser citado o patologista alemão Rudolf

Virchow (1821-1902), a quem se atribuí o estabelecimento das bases celulares das doenças. Por outro lado, também merece destaque o anatomista alemão Friedrich Jakob Henle (1809-1885), que considerava a possibilidade de fatores externos participarem no desenvolvimento de enfermidades. Apesar de reconhecer que microrganismos poderiam produzir doenças, Henle acreditava ser necessário mais do que uma simples associação destes com seu hospedeiro para confirmar um eventual potencial patogênico. Segundo Henle, seria possível demonstrar empiricamente a patogenicidade de um microrganismo caso ele fosse isolado de fluidos orgânicos contagiosos e a capacidade de infecção de ambos separadamente avaliados. Em virtude da inexistência de métodos práticos para separação e cultura de microrganismos, as proposições de Henle foram ignoradas pela comunidade científica de sua época.¹⁷

Em 1862, Robert Koch entrou na University of Göttinger para estudar Medicina e logo demonstrou sua aptidão para a pesquisa. Koch acabou por desenvolver novos métodos de cultura bacteriana e de coloração para a visualização das bactérias. Com seus métodos Koch conseguiu isolar e estudar o bacilo da tuberculose, descrevendo suas propriedades em cultura e sua aparência histológica. Além disso, cultivou esse bacilo por meses para então inocular animais de experimentação, que desenvolveram uma doença semelhante à tuberculose. Como controle-negativo, ele utilizou animais inoculados com soro, os quais não desenvolveram a doença. A partir dos resultados de seus trabalhos com doenças infecciosas (notadamente a tuberculose e o antrax), Koch elaborou

postulados de causalidade que apresentou no X Congresso Médico Internacional em Berlin, em 1890, sintetizados a seguir:

- I. O parasita tem que ocorrer em todos os casos da doença em questão e sob circunstâncias consideráveis para as mudanças patológicas e curso clínico da doença.
- II. O parasita não pode ocorrer em outra doença como casual ou como parasita não-patológico.
- III. Após ser totalmente isolado do corpo e repetidamente cultivado em cultura pura, o parasita pode induzir a doença novamente.

Quando essas condições eram satisfeitas, Koch afirmava que *“A ocorrência do parasita na doença pode não ser acidental, mas nesse caso nenhuma outra relação entre ele e a doença, exceto que o parasita é o causador da doença pode ser considerada.”* Posteriormente os postulados originais de Koch foram acrescidos de uma quarta premissa, que consiste no re-isolamento do microrganismo do hospedeiro inoculado experimentalmente.

Os postulados de Koch se aplicam adequadamente para doenças como a tuberculose. Todavia, até mesmo Koch tinha ciência dos limites de suas suposições: não era possível, por exemplo, atender a todos os postulados em doenças como o cólera e a lepra, ainda que já se soubesse que elas de fato são causadas por microrganismos. Essas limitações ficaram ainda mais evidentes com a descoberta de agentes que não podem ser facilmente mantidos em culturas, como o *Plasmodium falciparum*, o vírus da herpes simples (*Herpes Simplex Virus* - HSV) e outros vírus. Adicionalmente, doenças infecciosas equivalentes às

humanas com frequência não são reproduzidas em modelos animais (essencialmente porque seus agentes somente infectam humanos) e algumas infecções são subclínicas e/ou difíceis de serem identificadas¹⁷.

Diante dos problemas de associação etiológica particularmente notados às doenças causadas por vírus, em 1936 Thomas Rivers propôs novos postulados para o estabelecimento da relação entre infecção por esses microrganismos e o desenvolvimento de doenças. Rivers admitia que vírus patogênicos não precisam estar presente em todos os casos de uma dada doença e considerava relativa a necessidade de cultura, contrariando a idéia original de Koch. Segundo Rivers, vírus patogênicos devem estar presentes por um certo tempo nas lesões que causam e as doenças a eles associadas devem ser produzidas com certa regularidade após inoculação seqüencial de material orgânico infectado, incluindo sangue e exudatos. Aos postulados de Rivers, Heubner acrescentou dados epidemiológicos no critério de avaliação das causas de doenças, além de dados imunológicos e sorológicos que se tornaram mais amplamente adotados com a purificação do antígenos virais e a detecção de anticorpos específicos¹⁷.

A participação de microrganismos no desenvolvimento de neoplasias malignas tem recebido especial atenção nas últimas décadas. Por todo o século XX até a atualidade, evidências têm se acumulado de que alguns vírus têm papel importante na carcinogênese. Particularmente no que diz respeito à problemática de associação entre a infecção por agentes infecciosos e o desenvolvimento de neoplasias malignas, merecem destaque os critérios de Bradford Hill (1899-1991), sumarizados a seguir¹⁶:

-
1. *Força de associação*: Quanto mais forte é a relação entre o agente infeccioso e a doença, mais provável é a hipótese de que esse agente seja o causador da doença.
 2. *Temporalidade*: É necessário que a exposição ao agente infeccioso anteceda o aparecimento da doença.
 3. *Consistência*: devem ser semelhantes os resultados de associação obtidos por diferentes formas (e.g., amostras, circunstâncias e metodologias distintas).
 4. *Plausibilidade*: a relação de causa e consequência tem que ser racional e plausível com a base teórica existente.
 5. *Coerência*: A interpretação de causalidade tem que ser coerente com a teoria, não conflitando com o que já está descrito na literatura
 6. *Especificidade*: Na situação ideal, o efeito tem apenas uma causa.
 7. *Relação dose-resposta*: Quanto maior a infecção, maior é a gravidade da doença.
 8. *Evidência experimental*: A hipótese tem que ser passível de teste para ser comprovada ou descartada.
 9. *Analogia*: Um fenômeno de associação previamente validado em um contexto pode ser aplicado a outro.

Atualmente as hipóteses de associação entre vírus e cânceres são elucidadas com o emprego de parâmetros sorológicos e virológicos, incluindo a pesquisa de anticorpos circulantes contra componentes do vírus e a detecção do genoma viral ou seus produtos no tecido neoplásico. Por outro lado, é

imprescindível a demonstração da capacidade das células infectadas pelo vírus sofrerem transformação *in vitro*, bem como o desenvolvimento de tumores em animais de experimentação, seja por inoculação do vírus, seus produtos purificados ou mesmo células infectadas potencialmente transformadas¹⁷.

Em 1908 Ellerman e Bang demonstraram que um agente não-filtrável estava ligado ao desenvolvimento de leucemias em frangos. Em 1911, Peyton Rous determinou que um sarcoma de frango poderia ser transmitido por um filtrado livre de células tumorais. Digno de nota, era suposto que o sarcoma de frangos não seria transmissível, já se tinha tentado transmitir experimentalmente outros tipos de tumores, como de ratos, camundongos e cachorros, sem êxito. Ao contrário do esperado, pequenas quantidades de filtrado livre de células foram suficientes para transmitir o tumor a galinhas sadias¹⁸. Em 1936, Bittner identificou um RNA, posteriormente identificado como genoma de um retrovírus, que causava carcinoma mamário em camundongos. Ludwik Gross demonstrou em 1951 que leucemias e linfomas em ratos poderiam ser induzidas por infecções virais em animais recém-nascidos. Adicionalmente, em 1953 Gross isolou de ratos leucêmicos um vírus de DNA que induzia tumores - um poliomavírus¹⁹.

Em humanos, atualmente estão bem estabelecidas, por exemplo, as associações entre a infecção pelo vírus do papiloma humano (*Human Papillomavirus* - HPV) com o câncer de colo uterino e do vírus Epstein-Barr (*Epstein-Bar virus* - EBV) e o linfoma de Burkitt. Entretanto, o estabelecimento de relação etiológica entre infecção viral e o desenvolvimento de neoplasias malignas humanas é cercado de desafios biológicos e epidemiológicos. Dentre os mais

importantes estão o longo período entre o início da infecção e o desenvolvimento das lesões, a existência de co-fatores (ambientais, ocupacionais, susceptibilidade genética, entre outros), e a complexidade inerente ao fenômeno de carcinogênese viral. É importante notar que um mesmo vírus pode estar relacionado ao desenvolvimento de diferentes doenças, incluindo tipos distintos de neoplasias, e em cada uma desempenhar um papel patogênico específico, que pode inclusive ser influenciado por fatores sócio-geográficos e étnicos.²⁰

Estima-se que pelo menos 15% das neoplasias em humanos têm um importante componente infeccioso na sua etiologia. Entretanto, poucos vírus atualmente são considerados carcinogênicos para humanos. Dentre os vírus de RNA, apenas o vírus da Hepatite C (*Hepatitis C virus* – HCV), relacionado ao desenvolvimento do carcinoma hepático, e o vírus linfotrópico T humano tipo 1 (*Human T-lymphotropic virus type-1* - HTLV-1), relacionado à leucemia de células T de adultos²¹, são descritos. Dentre os de DNA, o HPV²², que causa o carcinoma de colo de útero; o vírus da hepatite B (*Hepatitis B virus* – HBV), também associado ao carcinoma hepático²³; o EBV, relacionado com o carcinoma indiferenciado de nasofaringe e alguns linfomas²⁴; e o KSHV/HHV-8, que participa no desenvolvimento do SK e doenças linfoproliferativas de pacientes imunodeprimidos²⁵. Apesar da participação de poliomavírus no desenvolvimento de neoplasias malignas em animais, ainda há controvérsias sobre a potencial associação de membros dessa família com neoplasias malignas humanas.¹⁶ Considerando a recente descrição de possível associação de um novo poliomavírus com o CCM¹⁵, esse panorama pode estar em vias de ser mudado.

2.3 Poliomavírus humanos

Os poliomavirus são vírus de DNA não-envelopados. A partícula viral tem geometria icosaédrica e seus capsídeos possuem cerca de 45µm de diâmetro. Seu genoma é composto de DNA de dupla-fita circular, com cerca de 5300 pares de bases²⁶, dividido em regiões não-codificantes e codificantes esta última classificadas ainda em unidades de transcrição precoce (*Early*) ou tardia (*Late*)²⁷.

O genoma dos poliomavirus não codifica proteínas de replicação, de modo que esses microrganismos necessitam utilizar a maquinaria do hospedeiro, particularmente ativa durante a fase S do ciclo celular. Para controle da maquinaria de replicação celular os poliomavírus se utilizam de proteínas expressas precocemente durante seu ciclo biológico, os antígenos *Large T* (T-Ag) e *Small T* (t-Ag). Os T-Ag interferem na atividade de duas importantes proteínas que regulam a progressão do ciclo celular: os produtos dos genes supressores tumorais *RB1* e *TP53*, denominadas pRb e p53, respectivamente²⁸. Está bem definido que o comprometimento das funções de pRb e p53 por T-Ag resulta em estimulação exacerbada do ciclo celular, favorecendo a transformação celular²⁹. Por outro lado, a função do t-ag é menos clara: embora não seja essencial para a replicação viral em cultura de tecidos, para a transformação celular ou indução tumoral, t-ag aumenta a transformação mediada por T-ag e é requerida para completar a transformação de células humanas *in vitro*. Também atua estimulando a telomerase em células humanas mesoteliais infectadas com o vírus símio 40 (*Simian Virus 40* - *SV40*). Além disso, dados recentes indicam que t-ag é requerido pelos T-ag para hiperregular a expressão de Notch-1, que participa de uma variedade de processos de controle sobre o destino das células³⁰.

O SV-40 foi descoberto em 1960 e contaminava vacinas contra o vírus da polio, produzida em culturas de células renais de primatas das espécies *Macacus rhesus* e *Macacus cynomolgus*, hospedeiros naturais do vírus. Trata-se de um poliomavírus oncogênico em roedores e capaz de transformar células humanas *in vitro*^{31, 32}. Dentre as neoplasias induzidas pelo SV40 em modelos animais estão cânceres cerebrais, mesoteliomas malignos, tumores ósseos e linfomas sistêmicos. Em algumas dessas doenças acometendo humanos também são detectados marcadores virais, sugerindo uma possível relação entre o SV40 e o desenvolvimento desses tumores³³. Digno de nota, seqüências do genoma viral foram detectadas com significativa freqüência em mesoteliomas humanos. Todavia, alguma dificuldade tem sido experimentada na reprodução desses resultados, levando alguns grupos de pesquisa a supor que a detecção do genoma do SV40 em neoplasias humanas seja artefato de contaminação de amostras³¹.

Outro fator que dificulta a associação do SV-40 com o desenvolvimento de cânceres em humanos é a escassez de dados epidemiológicos que sustentem essa hipótese. Além do contágio por meio da vacina contaminada pelo SV-40, não são conhecidas as vias de infecção de humanos pelo vírus. Em verdade, a Academia Nacional de Ciências do Instituto de Medicina dos EUA (National Academy of Sciences, *Institute of Medicine, USA* – IOM) indica que “A evidência foi inadequada para concluir se a vacina da polio contaminada pelo SV40 causava ou não câncer porque os estudos epidemiológicos são suficientemente falhos”³². Além disso, não se sabe se as perturbações causadas no ciclo celular pelo SV-40

são suficientes para desenvolver a transformação celular e o desenvolvimento de cânceres *in vivo* em humanos. Assim, a despeito de indícios biológicos do potencial carcinogênético de poliomavírus, inclusive na transformação de células humanas *in vitro*, até o momento não há dados consistentes que permitam relacionar a infecção por membros dessa família ao desenvolvimento de neoplasias malignas em humanos.

2.4 CCM e sua possível relação com um novo poliomavírus

Assim como o SK, o CCM ocorre mais freqüentemente entre os transplantados sob efeito da terapia imunossupressora e em pacientes portadores do vírus HIV. Essas similaridades levaram alguns pesquisadores a suspeitarem de o CCM também apresentar um agente infeccioso em sua etiologia.

Para procurar por seqüências virais no CCM, Feng e colaboradores utilizaram uma metodologia por eles desenvolvida, denominada subtração digital de transcriptomas (*Digital Transcriptome Subtraction* - DTS), capaz de identificar transcritos desconhecidos utilizando grandes quantidades de dados gerados por seqüenciamento de cDNA humano. Duas bibliotecas de cDNA foram preparadas: a primeira originada de RNAm total de um único tumor e a segunda de RNAm de três tumores diferentes unidos, a fim de aumentar a probabilidade de detecção de seqüências virais raras.

Para fazer a DTS, seqüências de alta fidelidade de cDNA foram alinhadas contra seqüências humanas depositadas em bases de dados públicas. Seqüências sem alinhamento foram alinhadas à seqüências da base de seqüências não-redundantes do *GenBank* (*National Centers for Biotechnology*

Information - NCBI), empregando o algoritmo *BLASTX*. Após análise dos resultados, um transcrito remanescente se alinhou com alta homologia com seqüências do antígeno T do poliomavirus linfotrópico do macaco verde africano e ao poliomavirus humano BK. Um segundo transcrito, que não teve homologia completa com seqüências depositadas de poliomavirus, foi identificada com o alinhamento de seqüências de alta fidelidade não-conhecidas com o genoma de poliomavírus. Essas duas seqüências definiram um novo poliomavirus humano, que foi denominado pelos autores de MCPyV em virtude de sua identificação a partir do DNA extraído de CCM.

Com o objetivo de propiciar o desenho de iniciadores específicos para detecção do novo poliomavírus, subsequente foi realizado seqüenciamento automatizado de ácidos nucléicos de segmentos amplificados nas porções terminais 5' e 3' a partir de duas amostras de CCM. Para tanto foi realizada PCR empregando iniciadores consenso para a região VP1 de poliomavirus e procedimentos previamente descritos na literatura³⁴. Os amplicons obtidos foram recuperados em gel de agarose, clonados, seqüenciados e as seqüências utilizadas para desenho dos iniciadores VP1-iF e VP1-iR. Empregando os pares de iniciadores M6 / VP1-iR e M5 / VP1-iF os autores realizaram amplificações sucessivas de segmentos terminais 3' e 5', respectivamente, da seqüência do antígeno T até um sítio conservado de VP1. Com base no seqüenciamento dos amplicons, foram desenhados 13 grupos de iniciadores que circundam o genoma viral e possibilitaram seu completo seqüenciamento e anotação gênica preliminar.

Para investigar a associação entre o MCPyV e o CCM, foram analisados tumores de 10 pacientes com CCM e dois grupos controle de tecidos. O primeiro era composto de DNA extraído de 59 amostras de tecido de diferentes sítios de pacientes sem CCM, testadas com três pares de iniciadores para seqüências virais: LT1, LT3 e VP1. O segundo grupo controle era composto de DNA extraído de amostras de pele e de tumores de pele de 25 pacientes imunocompetentes e imunossuprimidos sem CCM, testados com os pares de iniciadores LT1 e VP1. As amostras foram selecionadas e testadas em ensaio cego e foi realizado *Southern Blotting* para aumentar a sensibilidade de detecção das seqüências virais após a amplificação por PCR.

Dos 10 tumores de CCM avaliados, 8 (80%) foram positivos para as sequencias do MCPyV por PCR. Sete tumores apresentaram elevado nível de amplificação e apenas um se revelou positivo somente após o *Southern blotting*. A ausência de seqüências do genoma do MCPyV no DNA de 2 tumores foi confirmada após tentativas sem sucesso de amplificação com todos os 13 grupos de iniciadores previamente desenhados. Nenhum dos 59 tecidos controle foram positivos após PCR convencional, mas 5/59 (8%) se revelaram fracamente positivos após *Southern blotting*. Seqüências do T-ag viral foram recuperadas de 3 dessas amostras, confirmando infecção pelo MCPyV, presumivelmente com baixa carga viral. Do mesmo modo, 4/25 (16%) das amostras do grupo de indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos foram positivas para seqüências do MCPyV.

Por fim, a integração do genoma viral no genoma humano foi confirmada pelo seqüenciamento de DNA. Adicionalmente, os autores verificaram que a integração do vírus no DNA dos tumores era clonal por meio da digestão com enzimas de restrição e *Southern blotting*.¹⁵

Em conjunto, os resultados obtidos por Feng e colaboradores demonstraram pela primeira vez, de maneira consistente, a presença de DNA de um novo poliomavírus no genoma de células do CCM. A integração clonal do MCPyV no CCM sugere que essa associação pode não ser casual, hipótese que é fortalecida pela frequência significativamente maior de detecção do vírus na neoplasia em comparação a outros tecidos de diferentes sítios anatômicos. Com o trabalho de Feng e colaboradores tem início o estudo da relação etiológica entre o CCM e o novo poliomavírus humano descrito, terreno no qual o presente trabalho busca contribuir com a apresentação dos dados iniciais da pesquisa do MCPyV em número significativo de casos de CCM de pacientes brasileiros.

3 Objetivos

- Avaliar retrospectivamente a presença de seqüências do MCPyV em biopsias de carcinomas de células de Merckel;
 - Analisar os resultados obtidos e os dados existentes na literatura acerca da possível relação entre os carcinomas de células de Merckel e a infecção por virus oncogênicos.
-

4 Casuística e Métodos

4.1 Seleção das amostras

Foram avaliadas 24 biopsias de CCM levantadas dos arquivos de patologia cirúrgica do Laboratório Consultoria em Patologia de Botucatu do período de 2004 a 2008. Os respectivos tecidos fixados e incluídos em parafina foram selecionados por patologista experiente e submetidos a extração de DNA, conforme descrito a seguir.

4.2 Extração de DNA de tecido incluído em parafina

Tomados os devidos cuidados para se evitar contaminação cruzada entre as amostras, foram obtidos de 3 a 4 cortes com 10µm de espessura de cada bloco de parafina selecionado com o auxílio de um micrótomo histológico, utilizado exclusivamente para obtenção de amostras para análise por métodos moleculares. Os cortes histológicos foram acondicionados em tubos de microcentrifuga estéreis devidamente identificados e submetidos a desparafinação. Inicialmente os tecidos foram incubados a 64°C por 10min para derretimento da parafina. Em seguida, cada tubo foi acrescido de xileno, incubado a 60°C por 10min e centrifugado a 15.600xg por 5 min. Foi efetuada a remoção do xileno e o procedimento foi repetido uma vez mais, ao que se seguiu a desidratação e reidratação dos cortes com duas passagens de etanol absoluto e uma de etanos 95%, intercaladas por incubação a 60°C por 10min e centrifugação a 15.600xg por 5 min. Subseqüentemente as amostras foram incubadas a 55°C por 10min para evaporação do etanol residual e receberam solução de digestão

TES (Tris-Cl pH 7,4 20mM / EDTA 20mM / SDS 1%) e proteinase K na concentração final de 400 µg/µL.

Após incubação *overnight* a 56°C para a digestão do tecido, foi realizada purificação do DNA com o sistema *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), conforme instruções do fabricante. Além de quantificação por espectrofotometria UV do DNA obtido, as amostras foram avaliadas quanto à capacidade de amplificar segmentos da região promotora do gene que codifica a interleucina 10 (IL-10) humana por PCR convencional a fim de se identificar eventuais casos falso-negativos em decorrência de qualidade insuficiente do DNA para amplificação *in vitro*. Segmentos que incluíam a posição -592 (utilizada para as amostras de 1 a 12) e -1082 (utilizada para as amostras de 13 a 24) do gene da IL-10 foram amplificados em reações contendo solução tampão (20mM de Tris-Cl pH 8,4, 50 mM de KCl) com 3,0mM ou 2,0mM de MgCl₂, respectivamente, 0,2mM de dNTPs, 1,25U de DNA polimerase e 0,4µM dos iniciadores para a posição -1082 (Mok 2.S/ Mok 2.A) ou 0,3µM dos iniciadores para a posição -592 (pIL10 1.S/ Mok 1.A). O programa de termociclagem empregado para ambas as reações foi de um ciclo a 94°C por 5 min. Seguido de 40 ciclos de 94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 min.

4.3 Pesquisa do MCPyV

A fim de detectar segmentos do genoma do MCPyV no DNA obtido de CCM, foi realizada PCR convencional com três pares de iniciadores descritos por Feng e colaboradores, dirigidos às regiões LT1, LT3 e VP1.

Os segmentos LT1 e LT3 foram amplificados em reações contendo solução tampão (20mM de Tris-Cl pH 8,4 / 50 mM de KCl), 2,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1,25U de DNA polimerase e 0,3μM de cada iniciador (LT1.S/LT1.A ou LT3.S/LT3.A). O programa de termociclagem empregado foi de um ciclo a 94°C por 5min, seguido de 40 ciclos de 94°C-30s, 58°C-30s e 72°C-30s e um ciclo de extensão final a 72°C por 7min. Para VP1, a reação de amplificação foi constituída de solução-tampão (20mM de Tris-Cl pH 8,4, 50 mM de KCl), 3,0mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 1,25U Taq DNA polimerase 0,30 μM de cada iniciador. A termociclagem para VP1 foi 94°C-7min, seguido de 45 ciclos de 94°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min e finalizando com 72°C-7 min. As seqüências dos iniciadores e o tamanho dos amplicons empregados estão demonstrados na tabela 1.

TABELA 1 - Seqüências dos iniciadores empregados e amplicons esperados nos experimentos de PCR

Reação	Amplicon	Iniciadores (5'-3')	Referência
pIL-10 -1082	130pb	Mok2S-5'-ATCCAAGACAACACTACTAA-3' Mok2A-5'-GTGGAAGAAGTTGAAATAAC-3'	35
pIL-10 -592	146pb	pIL-10.1S-5'-GAAGAGGTGGAAACATGTG-3' Mok1A-5'-TAAATATCCTCAAAGTTCC-3'	36 35
MCPyV LT1	440pb	LT1.S-5'-TACAAGCACTCCACCAAAGC-3' LT1.A-5'-TCCAATTACAGCTGGCCTCT-3'	
MCPyV LT3	309pb	LT3.S-5'-TTGTCTCGCCAGCATTGTAG-3' LT3.A-5'-ATATAGGGGCCTCGTCAACC-3'	15
VP1	352pb	VP1.S-5'-TGGATCTAGGCCCTGATTTT-3' VP1.A-5'-TTTGCCAGCTTACAGTGTGG-3'	

5 Resultados

Dentre as biopsias de CCM avaliadas, 10/24 (41,7%) eram provenientes de pacientes do sexo feminino e 14/24 (58,3%) do sexo masculino. A idade média global dos pacientes foi de 70,2 anos (DP= 9,9 anos), variando de 46 a 91 anos. A tabela a seguir apresenta os dados gerais sobre sexo e idade na causuística.

TABELA 2- Sexo e idade dos pacientes portadores de carcinoma de células de Merkel avaliados

Grupo (n)	Idade						Faixa etária (anos)
	Média (anos)	DP (anos)	CV (%)	Mediana (anos)	P ₂₅	P ₇₅	
Sexo feminino (10)	74,5	4,8	15,5	74,0	68,0	76,0	64-91
Sexo masculino (14)	67,0	10,5	6,4	69,0	59,5	76,0	46-84
Total (24)	70,2	9,9	7,1	71,0	63,0	76,0	46-91

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; P₂₅: percentil 25; P₇₅: percentil 75

Dados gerais dos casos de CCM avaliados e os resultados de pesquisa de segmentos do genoma do MCPyV por PCRs são apresentados na Tabela 3. Nos experimentos de PCR, 4/24 (16,7%) amostras apresentaram amplificação com os iniciadores LT1 e 11/24 (45,8%) com os iniciadores LT3, dirigidos ao genoma do MCPyV, conforme descrito por Feng e colaboradores. Apenas 4/24 (16,7%) amostras analisadas revelaram amplificação com os iniciadores VP1, consenso para poliomavírus. No computo geral, apenas 3/11 (27,3%) amostras foram consistentemente positivas para os três segmentos virais avaliados e nenhuma amostra revelou amplificação com os iniciadores consenso VP1 somente.

A Figura 1 apresenta experimentos representativos da pesquisa do MCPyV por PCR com os pares de iniciadores LT1, LT3 e VP1.

TABELA 3 - Relação dos pacientes analisados com os resultados da imunohistoquímica e das PCRs.

#	Sexo	Idade (anos)	Localização anatômico tumor	Imunoistoquímica			Experimentos PCR			Outras informações
				CK20	Cromo	Sinapto	LT1	LT3	VP1	
01	Masc.	55	Face anterior da coxa E.	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Lesão cística. Pos. CKs 40,48,50 e 50,6.
02	Masc.	74	Dorso escapular D.	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
03	Masc.	78	Tórax	Pos	-	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
04	Fem.	74	Adenomegalia inguinal E.	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos. CKs 40,48,50, 50,6 e Ki-67
05	Fem.	68	NR	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
06	Masc.	56	Antebraço D.	Pos	Pos	-	Neg	Pos	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
07	Masc.	69	Pele retroesternal	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
08	Masc.	78	Couro cabeludo	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
09	Masc.	69	Linfonodo inguinal	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
10	Masc.	NR	Pele cervical	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50, 50,6 e p63
11	Fem.	71	Linfonodo inguinal E.	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
12	Fem.	91	Face	Pos	Pos	-	Neg	Neg	Neg	Crescimento progressivo. Pos. CKs 40,48,50 e 50,6.
13	Masc.	46	NR	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Neg	Tumor recidivado. Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
14	Fem.	80	NR	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	-
15	Masc.	63	Exoftalmia	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
16	Fem.	71	Dorso da mão E.	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50, 50,6 e p63
17	Masc.	63	Região anal	Pos	Pos	-	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50, 50,6 e Ki-67
18	Fem.	76	NR	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	-
19	Fem.	NR	Nariz	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
20	Masc.	69	Pele esternal	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
21	Masc.	NR	Região glútea	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
22	Fem.	76	Face	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
23	Masc.	84	Malar D.	Pos	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6
24	Fem.	64	Perna E.	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos. CKs 40,48,50 e 50,6

CK20: citoceratina 20kDa; Cromo: cromogranina; Sinapto: sinaptofisina; CKs 40, 48, 50 e 50,6: citoceratinas de 40, 48 50 e 50,6 kDa, respectivamente; Ki-67: antígeno de proliferação celular (Clone MIB-1). p63: proteína de epitélio escamoso/transicional, células mioepiteliais. Pos: positivo, Neg: negativo, D.: direito, E.: esquerdo, ND: não disponível.

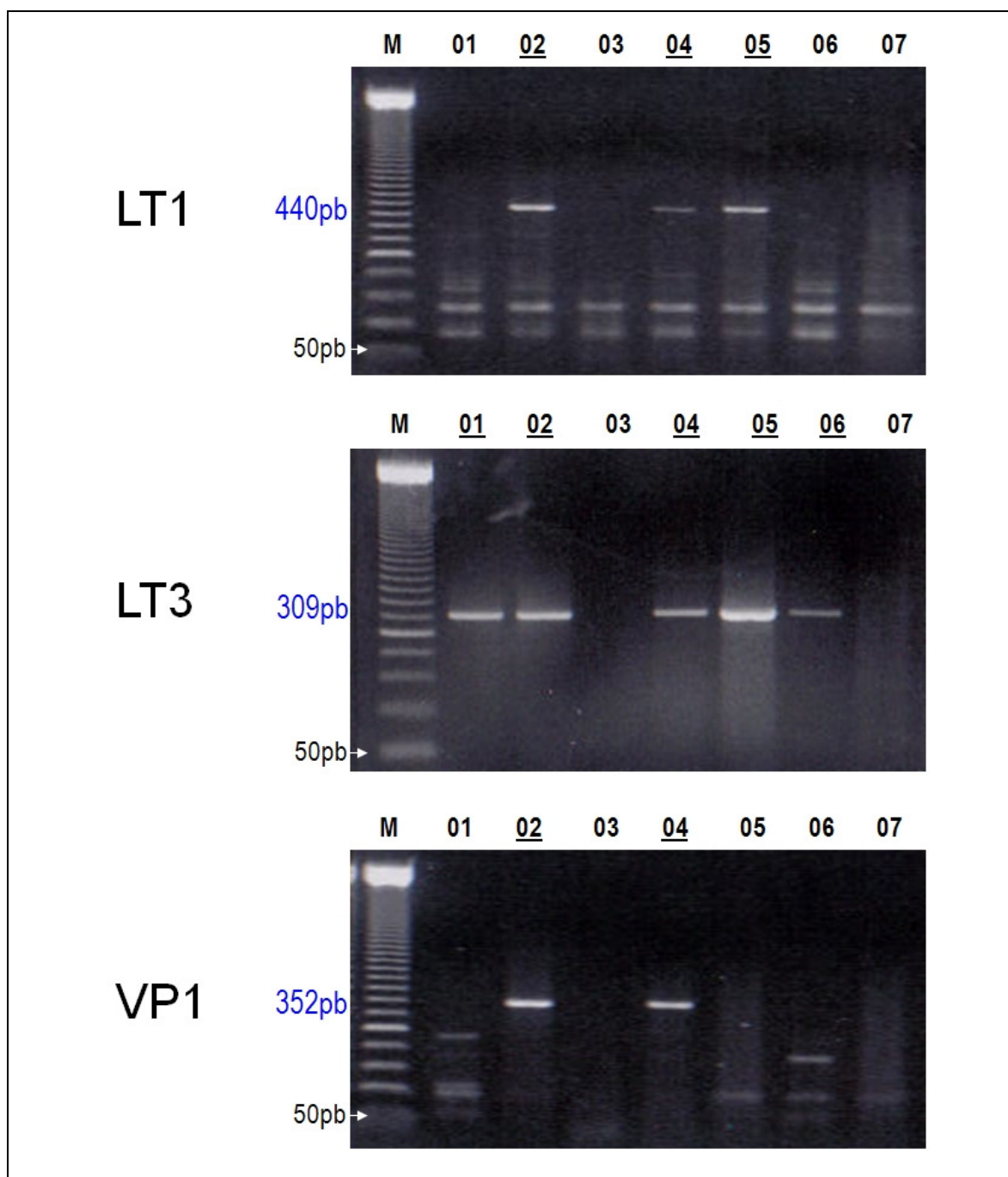


FIGURA 1 - Experimentos representativos da pesquisa de segmentos do genoma do MCPyV em amostras de DNA extraído de carcinomas de células de Merkel (CCM) por PCR com os pares de iniciadores LT1, LT3 e VP1. Estão destacadas as amostras que apresentam os amplicons esperados (440pb, 309pb e 352pb para LT1, LT3 e VP1, respectivamente). Os números das amostras correspondem ao número do caso indicado na Tabela 3. M – Marcador de peso molecular (múltiplos de 50pb).

6 Discussão

A despeito de ser uma neoplasia rara, em todo o mundo a incidência do CCM tem aumentado³⁷. Como acomete principalmente idosos e pacientes imunossuprimidos, é possível que a doença conte com a participação de agentes infecciosos para o seu desenvolvimento. Nessa linha, Feng e colaboradores isolaram e descreveram um novo poliomavírus humano, denominado MCPyV, identificado a partir da análise do transcriptoma da neoplasia. Assim, o CCM pode vir a ser o primeiro câncer humano em cuja etiopatogenia se verifique, de maneira consistente, a participação de um poliomavirus, pois até o momento é controversa a associação de outros membros dessa família com neoplasias humanas. Poliomavirus humanos como o BKPyV³⁸ e o JCPyV³⁹ causam infecções comuns na infância e são patogênicos apenas quando reativados em indivíduos imunossuprimidos, ocasionando nefropatias e a leucoencefalopatia multifocal progressiva em humanos, respectivamente.

No trabalho seminal de Feng e colaboradores, os autores acharam o genoma do MCPyV em 8/10 (80%) das amostras avaliadas. É importante notar que 6/9 (67%) dos casos foram positivos na pesquisa com iniciadores para LT1, 7/10(70%) para LT3 e 5/10 (50%) para VP1. Dentre os casos positivos, 4/8(50%) apresentaram amplificação com os três pares de iniciadores utilizados. No presente estudo, o genoma viral foi detectado em 11/24 (45,8%) das amostras avaliadas, sendo que a positividade para cada par de iniciador avaliado foi de 4/24(16,7%) para LT1, 11/24 (45,8%) para LT3 e 4/24 (16,7%) para VP1. Apenas 3/11(27,3%) foram positivas para os três pares de iniciadores utilizados. Saliente-

se, entretanto, que no presente trabalho apenas PCR convencional foi utilizada para a obtenção dos resultados, enquanto Feng e colaboradores utilizaram, além da PCR, hibridação do tipo *Southern blotting* para elevar a sensibilidade de detecção dos segmentos pesquisados do genoma do MCPyV.

Outras variações importantes entre o trabalho de Feng e colaboradores e o presente estudo devem ser consideradas na avaliação dos resultados preliminares obtidos. Em essência, são importantes as diferenças no tipo de amostras analisadas e o repertório de técnicas empregadas. Em seus experimentos, Feng e colaboradores utilizaram tecidos congelados, o que possibilita a extração de DNA de melhor qualidade e em maior quantidade. Além de partirem de DNA mais adequado para análise por métodos moleculares, em diferentes etapas os autores empregaram amplificação com PCR aninhada (*Nested-PCR*) e hibridação por *Southern Blotting*, estratégias que aumentam a sensibilidade de detecção de fragmentos de DNA. Essas abordagens foram utilizadas, inclusive, para reavaliação de amostras que originalmente revelaram-se negativas na PCR convencional.

A fim de avaliar um maior número de casos de CCM, no presente trabalho foram analisados tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (*Formalin-fixed paraffin embedded tissues* - FFPET) levantados retrospectivamente. Esse tipo de amostra caracteristicamente oferece ácidos nucléicos e proteínas de baixa qualidade e em quantidade menor em comparação a tecidos à fresco ou congelados. DNA extraído de FFPET apresenta elevado grau de fragmentação, o que dificulta a amplificação por PCR, particularmente de fragmentos com tamanho

superior a 400pb⁴⁰. Com relação aos métodos empregados, o uso de PCR convencional ao invés de PCR aninhada teve por objetivo minimizar o risco de resultados falso-positivos em virtude de reamplificações. Por outro lado, a execução de *Southern blotting* de fato contribuiria não só para aumentar a sensibilidade como também a especificidade de detecção do MCPyV nos casos de CCM avaliados. Entretanto, essa abordagem ainda não estava disponível para o presente estudo.

Outro ponto importante a ser considerado na análise dos resultados apresentados diz respeito aos iniciadores utilizados e sua capacidade de identificar segmentos do genoma do MCPyV de diferentes isolados virais. Esses iniciadores foram desenhados com base no genoma viral originalmente descrito por Feng e colaboradores, de modo que sua eficiência para amplificação de seqüências de outros novos isolados virais ainda é desconhecida. Esse problema pode se tornar ainda mais relevante caso venha a ser verificado elevada variabilidade genética entre isolados do MCPyV a serem oportunamente identificados e descritos.

A infecção por vírus oncogênicos favorece o desenvolvimento de tumores malignos. Sabe-se que para uma replicação eficiente, alguns vírus se utilizam de diferentes estratégias para controlar processos chaves, como o ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose.

Dentre essas estratégias está a instabilidade genética, que é uma das principais características apresentadas por todos os tipos de neoplasias. A instabilidade genética tem a função de proporcionar diferenças celulares que

permitam o surgimento de clones malignos com características vantajosas como baixa demanda de nutrientes, auto-suficiência na sinalização de crescimento, altos índices de proliferação, e evasividade do sistema imunológico, entre outros.⁴¹ Nesse contexto, oncoproteínas E7 do HPV induzem duplicação errônea do centrôssomo.⁴² Enquanto que a proteína E6 deste mesmo vírus sub-regula a enzima O⁶ metilguanina-DNA metiltransferase que participa do reparo do DNA e evita mutação em genes críticos, como o TP53.⁴³ Já a proteína X do EBV causa a formação anormal dos centríolos resultando em mitose multipolar e não balanceamento cromossomal.⁴⁴

Outra estratégia utilizada pelos vírus oncogênicos é a imortalização celular. Muitas células cancerígenas têm seus telômeros alongados pela expressão *de novo* da telomerase, um complexo enzimático formado por três componentes principais, dentre eles a enzima transcriptase reversa da telomerase.⁴⁵ O antígeno nuclear associado à latência 1 (latency-associated nuclear antigen 1- LANA 1) do KSHV/HHV-8, por exemplo, liga-se ao Sp 1 (um fator de transcrição), esse complexo trans-ativa o promotor da transcriptase reversa da telomerase aumentando sua expressão em células infectadas pelo vírus, fazendo com que a célula transponha o ponto final de senescência.⁴⁶

Os vírus oncogênicos conseguem induzir transformação maligna através de seus produtos que ou ativam protooncogenes ou desativam genes supressores tumorais. Proteínas E6 dos tipos genômicos de alto risco do HPV (HPV 16 e 18) causam degradação protossomal da p53.⁴⁷ Outro vírus que também tem como

alvo a p53 é o KSHV/HHV-8, cuja proteína LANA-1 reprime a atividade transcripcional do p53 inibindo a morte celular dependente da proteína p53.⁴⁸

Outra importante função dos vírus oncogênicos é o controle da apoptose celular interferindo diretamente na via das caspases. Células endoteliais vasculares infectadas por EBV que expressam LMP-1 são resistentes à apoptose. Essa resistência foi associada à inibição da expressão da caspase 3 e à super-regulação de genes anti-apoptóticos como o BIRC 3 e o TRAF 1.⁴⁹

Esses vírus também possuem a habilidade de modular o microambiente, causando a produção auto-sustentável onde citocinas e fatores de crescimento são liberados por células infectadas e não-infectadas, neoplásicas e não-neoplásicas. No Sarcoma de Kaposi, por exemplo, a proliferação de células malignas e de células atípicas é obtida através da intensa atividade de fatores angiogênicos que são produzidos tanto por células infectadas pelo KSHV/HHV-8 quanto por células inflamatórias não infectadas.⁵⁰

Os vírus oncogênicos também desenvolveram mecanismos para fugir das respostas imunológicas sub-regulando moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (major histocompatibility complex-MHC). Proteínas E5 do HPV, por exemplo impedem a maturação intracelular do MHC classe II *in vitro* diminuindo sua expressão na superfície da célula e, dessa forma, a célula não serve como apresentadora de antígenos.⁵¹ Já o KSHV/HHV-8 produz proteínas, a MIR1 e a MIR2, que aceleram a endocitose e a degradação do MHC classe I, fazendo com que as células infectadas não sejam detectadas por células T citotóxicas.⁵² Além disso, o KSHV/HHV-8 produz moléculas imunoregulatórias

homólogas as do hospedeiro que, ao contrário destas, possuem a função de inibir o sistema imunológico.⁵³

Com relação aos mecanismos mencionados, o caminho da infecção viral até a carcinogênese é vagaroso e ineficiente, pois apenas uma minoria de infecções de fato progride até o desenvolvimento de neoplasias malignas, para tanto dispensando anos ou mesmo décadas após o contágio. Adicionalmente, a infecção viral *per se* não é suficiente para o desenvolvimento de cânceres e outros agentes ambientais, além de fatores do hospedeiro (e.g., imunossupressão, mutações somáticas, susceptibilidade geneticamente determinada a exposição à carcinógenos, etc), exercem papel importante na transformação celular e desenvolvimento das lesões⁵⁴.

A despeito dos dados de Feng e colaboradores, parcialmente reforçados pela identificação do MCPyV na presente casuística de CCM, estabelecer que esse novo poliomavírus seja agente etiológico ou um dos fatores de risco para a neoplasia em questão requer cautela e estudos que vão além da detecção do genoma viral, incluindo dados epidemiológicos, sorológicos e sobre as características virológicas do MCPyV. Dentre as informações importantes que ainda não estão disponíveis para se elucidar a eventual relação de causalidade do MCPyV e o CCM estão dados sobre o potencial oncogênico *in vitro* e *in vivo* do vírus, sobre os mecanismos pelos quais ele pode atuar no desenvolvimento da neoplasia em humanos e informações essenciais sobre sua biologia, notadamente vias de transmissão, modos e frequência de exposição de populações humanas ao MCPyV.

O presente trabalho é um primeiro passo após o trabalho de Feng e colaboradores. Os resultados apresentados devem fomentar outros estudos para esclarecer as questões discutidas, mas que ainda não puderam ser respondidas. Outro ponto a se destacar é que um número considerável de casos de CCM, uma neoplasia maligna rara, foi utilizado; entretanto, a frequência de detecção do vírus pelos métodos moleculares empregados nesse estudo preliminar ficou aquém do esperado tendo em vista os resultados previamente publicados na literatura. O refinamento do presente estudo passa, necessariamente, pela avaliação potenciais efeitos negativos que a qualidade de DNA obtida de tecido processado e incluído em parafina possam ter nas taxas de detecção do MCPyV tendo em vista os iniciadores e condições de PCR empregados. Outro acréscimo importante, a avaliação de tecidos não-CCM para averiguação da frequência de detecção pelo MCPyV também deve enriquecer significativamente o estudo, trazendo maior clareza sobre a frequência e especificidade de associação desse novo vírus com o CCM.

7 Conclusões

- Foi detectada a presença do genoma viral em 11/24(45,8%) das amostras de CCM analisadas.
 - A diferença entre a frequência de detecção observada do MCPyV (45,8%) e a frequência previamente relatada em amostras de CCM pode estar relacionada ao tipo de amostras e às técnicas de análise empregadas.
 - Ainda não é possível estabelecer relação etiopatogenética entre infecção pelo MCPyV e o desenvolvimento do CCM, visto que não há informações suficientes na literatura para satisfazer os postulados atuais de causalidade. Para essa finalidade ainda são necessários, por exemplo, estudos sorológicos, virológicos e sobre as propriedades transformantes do MCPyV *in vitro* e seu potencial tumorigênico *in vivo*.
-

8 Referências Bibliográficas

- ¹Rocha FP, Menezes AMB, Almeida Junior HL, Tomasi E. Especificidade e sensibilidade de rastreamento para lesões cutâneas pré-malignas e malignas. **Revista de saúde pública**.2002;36:101-106.
 - ² Acarturk TO, Edington H, Nonmelanoma Skin Cancer. **Clinics in Plastic Surgery**.2005;32:237-248
 - ³ LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A. Pathology & Genetics skin Tumours. **WHO.IARC Press**.Lyon.2006
 - ⁴ Goessling W, Mckee PH, Mayer RJ. Merkel Cell carcinoma. **Journal of clinical oncology**.2002;20(2):588-598.
 - ⁵ Antman K, Chang Y. Kaposi's Sarcoma. **New England Journal of Medicine**.2000;342:1027-1038.
 - ⁶ Schulz TF. Epidemiology of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus/ human herpesvirus 8. **Advances in Cancer Research**.1999;76:121-160
 - ⁷ Hang Y, ET AL. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. **Science**. 1994;266:1865-1869
 - ⁸Edelman DC. Human herpesvirus-8 a novel human pathogen. **Virology Journal**. 2005;2:78-100.
 - ⁹ Jenner RG, Boshoff C. The molecular pathology of Kaposi sarcoma associated herpesvirus. **Biochimica et Biophysica Acta**.2002;1602:1-22.
 - ¹⁰ Pectasides.D, Pectasides.M, Econopoulos. T. Merkel cell cancer of the skin.**Annals of Oncology**. 2006;17:1489-1495
 - ¹¹ Poulsen. M. Merkel-cell carcinoma of the skin. **The Lancet Oncology**. 2004;5:593-599
 - ¹² Veness. MJ. Merkel cell carcinoma (primary cutaneous neuroendocrine carcinoma): An overview on management. **Australian Journal of dermatology**. 2006;47: 160-165
 - ¹³ Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol*.1972;105:107-110
 - ¹⁴ Miller RW, Rabkin CS. Merkel Cell Carcinoma and Melanoma etiological similarities and differences. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventions**.1999; 8:153-158.
 - ¹⁵ Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a Polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. **Science**.2008;319 (5866): 1096-1100
 - ¹⁶ Butel J, Goedert J. Connecting viruses to câncer: how research moves from association to causation. **Journal of the National Câncer Institute**. 2004; 96(4):256-257.
 - ¹⁷ Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of Microbial Pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. **Clinical Microbiology reviews**. 1996; 9(1):18-33.
-

-
- ¹⁸ Rous, P, "A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells", **J. Exp. Med.**1911;13(4):397-411
- ¹⁹ Hausen H. Viruses in Human Tumors- reminiscences and perspectives. **Advances in Cancer research**.1996;68:1-21.
- ²⁰ Evans AS, Mueller NE. Viruses and câncer: causal associations. **AEP**. 1990;1 (1):71-92
- ²¹ Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ. Human RNA "rumor" viruses: the searcho for novel human retrovirus in chronic disease. **Microbiology and molecular biology reviews**.2008;72(1):157-196.
- ²² Koshiol J, ET AL. Persistent human pappilomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of epidemiology**.2008;1:1-15.
- ²³ Llovet JM, Burrougs A, Bruix J. Hepatocelular carcinoma. **Lancet**.2003; 362(9399):197-17.
- ²⁴ Gulley ML, Tang W. Laboratory Assays for Epstein-Bar vírus-related disease. **Journal of Molecular diagnosis**.2008;10(4):279-292
- ²⁵ Chang Y, ET AL. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-assiciated Kaposi's sarcoma.**Science**.1994;266(5192):1865-1869.
- ²⁶ Hirsch HH, steiger J. Polyomavirus BK. **The Lancet Infectious diseases**.2003;3:611-623.
- ²⁷ Khalili K, Sariyer Ik, Safak M. Small Tumor antigen of poliomaviruses: role in viral life cycle and cell transformation.**Journal of cellular physiology**.2008;215:309-319.
- ²⁸ Moens U, Seternes OM, Johansen B, Rekvig OP. Mechanisms of transcriptional Regulation of Cellular Genes by SV40 Large-T and Small T-antigens. **Virus genes**. 1997;15(2):135-154
- ²⁹ Vilchez RA, Butel JS. Emergent human pathogen simian virus 40 and its role in cancer. **Clinical Microbiology reviews**. 2004;17(3):495-508.
- ³⁰ Bocchetta m, Miele L, Pass HI, Carbone m. Notch-1 induction, a novel activity of SV40 required for growth of SV40 transformed human mesothelial cells. **Oncogene**. 2003;22:81-89.
- ³¹ Cerrano PG et al. Simian virus 40 and malignant mesothelioma (Review). **International Journal of oncology**. 2003; 22:187-194.
- ³² Dang-Tan T, Mahmud SM, Puntoni R, Franco EL. Polio vaccines, Simian Virus 40, and human cancer: the epidemiologic evidence for a causal association. **Oncogene**. 2004;23:6535-6540.
- ³³ Vilchez RA, ET AL. Simian vírus 40 in human cancers. **The american journal of medicine**.2003;114(8):675-684.
-

-
- ³⁴ John R, Enderlein D, Nieper H, Muller H. Novel polyomavirus detected in feces of a chimpanzee by nested broad-spectrum PCR. **Journal of virology**.2005;79(6):3883-3887
- ³⁵ Mok CC, et al. Interleukin-10 promoter polymorphism in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatology**. 1998;41:1090-1095.
- ³⁶ Da Silva GN, Bacchi MM, Rainho CA, de Oliveira DE. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. **Archives of pathology & laboratory medicine**.2007;131 (11):1691-1696.
- ³⁷ Bichakjian CK, et al. Merkel cell carcinoma:critical review with guidelines for multidisciplinary management.**Cancer**.2007;110:1-12.
- ³⁸ Hirsch HH, Steider J. Polyomavirus BK Reviews. **The lancet infectious diseases**.2003;6:611-623
- ³⁹ Berger JR. Progressive multifocal leucoencephalopathy. **Current neurology and neuroscience reports**.2007;7(6):461-469.
- ⁴⁰ Inadome Y, Noguchi M. Selection of higher molecular weight genomic DNA for molecular diagnosis from formalin-fixed material.**Diagnostic molecular of Pathology**.2003;12(4):231-236.
- ⁴¹ Elgui de Oliveira D. DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. **Cancer Letters**.2007;247:182-196.
- ⁴² Heselmeyer K, et al. Advanced-stage cervical carcinomas are defined by a recurrent pattern of chromosomal aberrations revealing high genetic instability and a consistent gain of chromosome arm 3q.**Genes chromosomes cancer**.1997;19:233-240.
- ⁴³ Srivenugopal KS, Ali-Osman F. The DNA repair protein, O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. **Oncogene**.2002;21:5940-5045.
- ⁴⁴ Forgues M et al. Involvement of Crm 1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. **Molecular and cellular biology**.2003;23:5282-5292
- ⁴⁵ Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells. **Nature genetics**.2000;26:447-450.
-

-
- ⁴⁶ Verma SC, Borah S, Robertson ES. Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus up-regulates transcription of human telomerase reverse transcriptase promoter through interaction with transcription factor Sp 1. **Journal of Virology**.2004;78:10348-10359.
- ⁴⁷ Scheffner M, Whitaker NJ. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. **Seminars in cancer biology** .2003;13:59-67.
- ⁴⁸ Friborg Jr J, Kong W, Hottinger MO, Nabel GJ. P53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. **Nature**.1999;402:889-894.
- ⁴⁹ Xiong A, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activates nuclear factor-kappa B in human endothelial cells and inhibits apoptosis. **Transplantation**.2004;78:41-49.
- ⁵⁰ Ensoli B, Sturzl M. Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. **Cytokine Growth Factor Review**.1998;9:63-83.
- ⁵¹ Zhang S, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratocytes treated with interferon-gamma. **Virology**.2003;310:100-108.
- ⁵² Coscoy L, Ganem D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis.**Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**.2000;97:8051-8056.
- ⁵³ Moore OS, Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin?.**Annual review of microbiology** .2003;57:609-639.
- ⁵⁴ Liao JB. Viruses and human cancer. **Yale Journal of biology and medicine**.2006;79:115-122.
-