



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**ANA LUÍSA SANTOS AFONSO**

***POLIOMAVÍRUS NA ONCOGÉNSE DO  
CARCINOMA DE MERKEL***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE DERMATOLOGIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
DOUTOR RICARDO VIEIRA**

**[MARÇO/2012]**

**Faculdade de Medicina Da Universidade De Coimbra**

**POLIOMAVÍRUS NA ONCOGÉNSE DO CARCINOMA DE**  
**MERKEL**

Ana Luísa Santos Afonso

Mestrado Integrado em Medicina – 6º ano

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Morada: Rua Bernardo Albuquerque, nº137, 1ºF, 3000-071 Coimbra

Correio electrónico: [anamailafonso@gmail.com](mailto:anamailafonso@gmail.com)

*O meu profundo agradecimento ao meu orientador de tese, Doutor Ricardo David Vieira pelo apoio, ajuda e simpatia, desde o início em que aceitou coordenar o desenvolvimento da mesma.*

*Aos meus pais, irmão, amigos, colegas e todos aqueles que, directa ou indirectamente, me auxiliaram na concretização deste projecto.*

# Índice

<b>Resumo</b>	4
<b>Palavras-Chave</b>	5
<b>Abstract</b>	6
<b>Key-Words</b>	7
<b>Introdução</b>	8
<b>Contexto Histórico</b>	10
<b>Epidemiologia</b>	12
<b>Apresentação clínica</b>	14
<b>Histologia e imuno-histoquímica</b>	17
<b>Aspectos histológicos</b>	17
<b>Microscopia electrónica</b>	19
<b>Caracterização imuno-histoquímica</b>	19
<b>Patogénese</b>	21
<b>Considerações moleculares no processo de oncogénese</b>	21
<b>Poliomavírus MCPyV</b>	29
<b>Associação MCPyV e Carcinoma de Merkel</b>	37
<b>Radiação Ultravioleta</b>	51
<b>Estadiamento</b>	55
<b>Tratamento</b>	59
<b>Vigilância. Prognóstico</b>	63
<b>Conclusão</b>	65
<b>Referências Bibliográficas</b>	67

## Resumo

O carcinoma de Merkel é uma neoplasia cutânea rara, de provável origem neuro-endócrina, que exhibe um comportamento biológico agressivo. Nas últimas décadas assistiu-se a um aumento significativo da sua incidência.

Apesar de serem apontados como factores de risco a imunossupressão, idade superior a 50 anos e a exposição à radiação solar, o processo de oncogénese permanece por esclarecer.

Neste sentido, vários estudos genéticos e moleculares descrevem associações com alterações cromossómicas, vias apoptóticas e proliferação celular. Recentemente, na base da hipótese de uma infecção viral poder actuar como factor oncogénico, é identificado material genómico de um novo poliomavírus humano – poliomavírus das células de Merkel - integrado no DNA das células tumorais em cerca de 70-80 % dos casos, sustentando assim uma relação entre a infecção pelo referido vírus e o processo de oncogénese.

Um outro aspecto relevante é o facto da maioria das lesões se localizarem frequentemente em áreas foto-expostas e a existência de casos de aparecimento síncrono e/ou metácrono deste tumor e outros tumores cutâneos cuja etiologia é fortemente atribuída à radiação ultravioleta.

Assim, este trabalho propõe apresentar uma revisão sobre o papel deste poliomavírus na oncogénese do carcinoma de Merkel, abordando ainda, a questão da radiação ultravioleta como factor concorrente para o mesmo.

Para a execução desta revisão, foi realizada uma pesquisa bibliográfica baseada sobretudo nas fontes médicas *Pubmed/MedLine* desde Janeiro de 2000 até Dezembro de 2011.

**Palavras-chave:**

Carcinoma de Merkel; Oncogénese; Poliomavírus das células de Merkel; Radiação Ultravioleta

## **Abstract**

Merkel cell carcinoma is a rare cutaneous neoplasia, of probable neuroendocrine origin, that shows an aggressive biological behavior. In the last few decades a significant increase of its incidence was observed.

Although immunosuppression, age over 50 years-old and sun exposure are pointed as risk factors, the process of oncogenesis remains unclear.

Some genetic and molecular studies describe associations with chromosomal alterations, apoptotic ways and cellular proliferation. Recently, based on the hypothesis of a viral infection being an oncogenic factor, genomic material of a new human polyomavirus – Merkel cells' polyomavirus - was integrated in tumor cells' DNA in about 70 - 80% of the cases, supporting a relationship between viral infection and the oncogenic process.

On the other hand, the majority of lesions are located in photo-exposed areas and there are cases of synchronous and/or metachronous occurrences of this tumor and other cutaneous tumors whose etiology is strongly attributed to UV radiation.

This issue presents a revision on the role of this polyomavirus in the oncogenic process of Merkel cell carcinoma, as well as UV radiation as competing factor for the same.

For the execution of this work a bibliographical research mostly based in medical sources *Pubmed/MedLine* was carried through, since January of 2000 until December of 2011.

**Key-words:**

Merkel cell carcinoma; Oncogenesis; Merkel cells' polyomavirus; Ultraviolet radiation.



## **Introdução**

O carcinoma de Merkel (CM), descrito pela primeira vez em 1972, é uma neoplasia cutânea rara, com evolução agressiva, que ocorre primariamente em indivíduos idosos, imunodeprimidos e com maior exposição à radiação solar. Apesar da maioria dos autores estabelecer uma origem neuro-endócrina, permanecem controvérsias em relação à célula de origem desta lesão. (Houben et al., 2009) (Pulitzer et al., 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010)

A evolução verificada em termos de reconhecimento clínico de lesões suspeitas e das técnicas de imuno-histoquímica facilita o processo de diagnóstico, permitindo verificar um aumento crescente da incidência desta lesão, com valores superiores aos verificados no caso do melanoma. (Vilar-Coromina et al., 2009)

Em termos clínicos, traduz-se habitualmente por uma lesão papulosa ou nodular eritematosa em área corporal foto-exposta, não dolorosa, de expansão rápida. (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010) A nível histológico, apresenta-se como uma lesão de localização preferencialmente dérmica, cujas células tumorais, tipicamente com núcleo grande e vesicular, nucléolo pequeno e citoplasma escasso, estão frequentemente agrupadas em cordões ou ninhos. São descritos três padrões histológicos: trabecular, intermédio e células pequenas. A nível imuno-histoquímico a lesão mostra positividade para marcadores epiteliais e neuro-endócrinos. (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010)

No campo da patogénese vários estudos focam alterações moleculares nos processos de crescimento celular, apoptose, angiogénese e regulação do ciclo celular. Recentemente, em 2008, são identificadas seqüências de DNA, em células de CM, reconhecidas como

pertencentes a um novo poliomavírus humano – poliomavírus das células de Merkel, MCPyV. (Feng et al., 2008) (Houben et al., 2009)

A família *Poliomaviridae*, da qual faz parte o referido vírus, inclui ainda os poliomavírus humanos BK, JC, KI, WU, e os mais recentes poliomavírus humano 6 e 7 e poliomavírus associado à tricodisplasia espinhosa. (Schowalter et al., 2011) (Kuwamoto, 2011)

Assim, o MCPyV é um vírus de DNA, com cápside e sem envelope, possuindo um diâmetro entre 40 – 50 nm. O material genómico compreende uma região de controlo transcricional, os genes de transcrição precoce e os de transcrição tardia.

De referir ainda, que a exposição e infecção primária aos poliomavírus humanos ocorre na maioria dos casos durante a infância, sendo atribuído potencial oncogénico apenas ao MCPyV. (Hausen, 2008) (Houben et al., 2009) (Johnson, 2010) (Becker, 2010) (Schowalter et al., 2011)

O presente trabalho visa expor uma revisão sobre o papel do poliomavírus MCPyV no processo de oncogénese do CM, nomeadamente a nível das alterações moleculares nas células tumorais e implicações histológicas e clínicas da infecção pelo mesmo. Por outro lado, é abordado o contributo da radiação UV como factor oncogénico no desenvolvimento desta lesão tumoral.

Para a execução da presente revisão foi realizada uma pesquisa bibliográfica baseada sobretudo nas fontes médicas *Pubmed/MedLine* desde Janeiro de 2000 até Novembro de 2011.

## Contexto histórico

Descrito inicialmente por Cyril Toker, em 1972, foi designado “carcinoma trabecular cutâneo”, uma variante do carcinoma das glândulas sudoríparas, com localização dérmica e composto por trabéculas, ninhos ou cordas de células com núcleo grande, vesicular e citoplasma escasso. Verificou-se que apresentava maior incidência nas faixas etárias mais avançadas, estando associado a elevado risco metastático e alta taxa de recorrência. (Pulitzer et al., 2009) (Wong & Wang, 2010) (Kuwamoto, 2011)

Em 1978, Tang e Toker identificaram, recorrendo à microscopia electrónica, grânulos densos, neuro-secretóres, nas células tumorais o que permitiu a inclusão da lesão nos carcinomas neuro-endócrinos. (Karthi & Sundram, 2008) (Houben et al., 2009) (Kuwamoto, 2011) Reconheceu-se assim, a semelhança com as células de Merkel uma vez que estas seriam as únicas células, com localização cutânea, que continham tais grânulos. (Houben et al., 2009) Deste modo, deduziu-se que este carcinoma derivaria destas.

Posteriormente, novas denominações foram atribuídas: “carcinoma neuroendócrino cutâneo”, “carcinoma de células pequenas primário cutâneo” e ainda, “APUDoma cutâneo”. (Vilar-Coromina et al., 2009) Em 1980, é proposta a designação “carcinoma de Merkel” que prevaleceu até à actualidade. (Houben et al., 2009)

Numa breve referência, as células Merkel foram identificadas em 1875 por Friedrich S. Merkel. Localizam-se na derme, estão amplamente distribuídas pela pele especialmente na glabra, particularmente nos dedos, palmas, plantas, lábios, outras zonas da face e superfície ventral dos braços, e têm funções de mecanorreceptores ou quimiorreceptores, sendo consideradas como parte do sistema neuro-endócrino difuso. (AG Rockville MCC Group, 2009) (Wong & Wang, 2010)

Actualmente, é controversa a origem deste tumor, com novas evidências apontando para células pluripotentes epidérmicas que adquirem características neuro-endócrinas durante o processo de malignização. (Pectasides et al., 2006) (Houben et al., 2009) (Becker, 2010) Também a origem das próprias células Merkel, provavelmente derivadas de uma divisão celular assimétrica de queratinócitos basais, é questionada. (Houben et al., 2009) (Sastre-Garau et al., 2009)

## **Epidemiologia**

Os dados epidemiológicos referentes a esta neoplasia são limitados, não apenas por se tratar de uma lesão rara cuja histogénese é ainda matéria de debate mas também, devido à evolução no campo da imuno-histoquímica que permitiu uma maior precisão diagnóstica. (Vilar-Coromina et al., 2009)

A nível europeu, as estatísticas populacionais são limitadas. Em Espanha, o número de casos de CM diagnosticados em 2007 rondou os 140, perfazendo 0,5% de todos os casos de neoplasias cutâneas. (Vilar-Coromina et al., 2009) Num estudo realizado na Dinamarca, registou-se uma incidência crescente entre 1978-2006, alcançando um total de 2,2 casos por milhão de pessoas entre 1995-2006 (Kaae et al., 2010); já na Finlândia, entre 1987-2001, registou-se uma prevalência anual de 0,2 casos por 100000 pessoas. (Pectasides et al., 2006)

Nos EUA, a incidência do CM, ajustada à idade, é de cerca de 3,2 por 100000 pessoas por ano, perfazendo um total de aproximadamente 1500 novos casos anuais. A incidência crescente desta neoplasia reflecte-se no acréscimo anual de 8% entre 1986-2001 (Zager et al., 2011), aumento preocupante em comparação com as estatísticas referentes ao melanoma, que apontam para 3% no mesmo período. Assim, nos últimos 15 anos, o número de novos diagnósticos triplicou. (Becker, 2010)

A faixa etária onde é registada maior incidência desta neoplasia compreende a 7<sup>a</sup>-8<sup>a</sup> décadas de vida (Wong & Wang, 2010) (Kuwamoto, 2011), verificando-se um aumento paralelo com a idade a partir dos 50 anos. (Rockville MCC Group, 2009) Apresenta uma maior prevalência entre a raça caucasiana, principalmente entre indivíduos europeus, contrastando com a baixa incidência na raça negra (0,01 casos por 100000) e na Polinésia. (Pectasides et al., 2006) Finalmente, mostra um ligeiro predomínio no sexo masculino.

(Pectasides et al., 2006) (Pulitzer et al., 2009) (Sihto et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Kaae et al., 2010) (Kuwamoto, 2011)

Os factores de risco conhecidos que concorrem para um aumento do risco de desenvolvimento de CM compreendem idade acima dos 50 anos, exposição à radiação solar e imunossupressão. Indivíduos com diagnóstico de SIDA têm um risco 11-13 vezes maior e pacientes submetidos a transplantes de órgão 5-10 vezes superior ao da população em geral (Heath et al., 2008) (Houben et al., 2009) (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Kaae et al., 2010) (Zager et al., 2011) (Kuwamoto, 2011), acrescentando ainda, que em ambos o diagnóstico de CM é geralmente efectuado mais cedo (50% antes dos 50 anos). (Becker, 2010)

Há também referências a aumento do risco em indivíduos com diagnóstico de carcinoma basocelular há mais de 1 ano, carcinoma espinhocelular ou linfoma Hodgkin bem como em indivíduos com diagnóstico actual ou antecedentes de melanoma, leucemia linfocítica crónica ou linfoma não Hodgkin. (Kaae et al., 2010)

## **Apresentação clínica**

Trata-se de uma entidade com expressão clínica variável, muito inespecífica, cujo diagnóstico raramente é suscitado numa primeira abordagem ao doente. (Wong & Wang, 2010) (Kuwamoto, 2011)

Habitualmente, traduz-se por uma lesão papulosa ou nodular eritematosa, assintomática, com consistência dura-elástica, de tamanho geralmente inferior a 2 cm, não dolorosa. (Fig. 1) (Pectasides et al., 2006) (Rockville MCC Group, 2009) (Wong & Wang, 2010) (Kuwamoto, 2011) O crescimento é habitualmente rápido, em semanas ou meses. (Pulitzer et al., 2009)

Pode apresentar-se, menos comumente, como placa, especialmente no tronco, (Becker, 2010) ou nódulos solitários azulados, duros, de formato esférico. (Wong & Wang, 2010) A superfície da lesão é geralmente lisa e brilhante mas pode apresentar ulcerações, indícios de estágio tumoral avançado, aspecto acneiforme ou com telangiectasias. (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010) Note-se que subgrupos de CM associados a carcinoma espinhocelular cutâneo tendem a ter uma apresentação típica destes: escara, crosta e/ou ulceração. (Pulitzer et al., 2009)

Dada a rapidez de disseminação pelo sistema linfático dérmico, podem ocorrer metástases satélites muito precocemente. (Pectasides et al., 2006) (Becker, 2010)

Em termos de distribuição anatómica das lesões, as zonas mais atingidas englobam a cabeça, na face há a salientar o atingimento preferencial das pálpebras, e região cervical (> 50% dos casos), seguidas pelas extremidades (40-35%), tronco (< 10%) e em casos excepcionais, as mucosas oral e genital. (Pectasides et al., 2006) (Heath et al., 2008) (Wong & Wang, 2010)

O acrónimo - AEIOU – conjuga várias características clínicas típicas de CM que, quando presentes, podem levar à suspeita do seu diagnóstico: **A** – assintomático/não doloroso à palpação; **E** – expansão rápida (< 3 meses); **I** – imunossupressão; **O** – (*older*) idade superior a 50; **U** – localização em zonas foto-expostas. (Heath et al., 2008) (Wong & Wang, 2010) Num estudo, mais de 89% dos pacientes com CM conciliaram três ou mais destes critérios. (Heath et al., 2008)

No momento do diagnóstico, a maioria dos pacientes apresenta doença localizada (70-80%), os restantes apresentam disseminação tumoral para os gânglios linfáticos regionais e/ou metástases cutâneas e menos comumente lesões à distância, preferencialmente para fígado, ossos, pulmão e cérebro. (Pectasides et al., 2006) (Pulitzer et al., 2009)

A percentagem de casos com doença mais avançada ao diagnóstico aumenta em pacientes com algum grau de imunossupressão. (Heath et al., 2008) Note-se ainda que existem casos reportados de pacientes com invasão dos gânglios linfáticos regionais sem evidências de CM primário, fenómeno denominado por regressão do tumor cutâneo. (Pulitzer et al., 2009)





**Fig. 1** – Apresentação clínica do CM.

Fonte: Serviço de Dermatologia, CHUC.

## **Histologia e imuno-histoquímica**

### **Aspectos histológicos**

Histologicamente, o CM apresenta-se predominantemente como uma lesão de localização dérmica, podendo envolver estruturas mais profundas ou a epiderme (cerca de 5-30% dos casos). (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Wong & Wang, 2010) Tipicamente, estende-se pela derme reticular e tecido subcutâneo, poupando a derme papilar, epiderme e anexos. (Wong & Wang, 2010)

A lesão é geralmente assimétrica, com margens irregulares, mostrando um padrão de crescimento periférico infiltrativo. (Pulitzer et al., 2009) As células tumorais mostram-se agrupadas em cordões ou ninhos e frequentemente o índice mitótico é elevado, observando-se muitas mitoses atípicas, corpos apoptóticos e invasão vascular, linfática e perineural. (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Becker, 2010)

Podem existir ainda, infiltrado inflamatório linfocítico, fenómenos de angiogénese peri e intra-tumoral e deposição de substância amilóide. (Pulitzer et al., 2009)

As células tumorais são monomórficas (Becker, 2010), possuem um núcleo grande com um padrão típico de distribuição da cromatina e citoplasma escasso com grânulos argirófilos, frequentemente com finas extensões citoplasmáticas. (Pulitzer et al., 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010) A tríade núcleo vesicular com nucléolo pequeno, mitoses e apoptoses abundantes é altamente sugestiva de CM. (Pectasides et al., 2006)

De acordo com a organização e características das células podem ser distinguidos três padrões histológicos: trabecular, intermédio e células pequenas. O mais comum é o padrão intermédio (cerca de 80%), caracterizado por grupos difusos de células basofílicas cujo

tamanho celular é intermédio, os núcleos são grandes e lobados, os nucléolos imperceptíveis e o citoplasma escasso.

A variante de células pequenas (cerca de 10%) caracteriza-se por tamanho celular reduzido, núcleos ovais hipercromáticos e nucléolos proeminentes; e a variante trabecular (restantes 10%) caracteriza-se por células poligonais organizadas em trabéculas, com núcleos vesiculares, redondos, localizados centralmente e citoplasma abundante. (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010)

Frequentemente, existem formas mistas ou mesmo transicionais entre as três variantes descritas. (Rockville MCC Group, 2009) (Wong & Wang, 2010) Podem ainda, co-existir componentes tumorais com diferenciação écrina, escamóide, glandular e melanocítica. (Wong & Wang, 2010) (Kuwamoto et al., 2011)

Apesar da maioria dos CM se desenvolverem de novo, histologicamente designados puros, há casos descritos de associação com outras lesões tumorais, na maioria carcinomas espinhocelulares cutâneos (colocando-se mesmo a hipótese de um subgrupo de CM representarem carcinomas bifenotípicos), e menos comumente com carcinoma de células basais, tumores anexiais e quistos. (Pulitzer et al., 2009) (Wong & Wang, 2010) Relatam-se igualmente, variantes raras de CM com componente sarcomatóide associada (com aspecto semelhante a fibroxantoma atípico, fibrossarcoma, leiomiossarcoma ou rabiomiossarcoma); bem como lesões com características de paragangliomas. (Pulitzer et al., 2009)

## **Microscopia electrónica**

Estudos com microscopia electrónica revelam grânulos citoplasmáticos, na periferia celular, densos, com diâmetro compreendido entre 80-120 nm, bem como grupos de filamentos intermédios adjacentes ao núcleo (Pulitzer et al., 2009) (Becker, 2010).

Actualmente, os estudos de microscopia electrónica não são usados para diagnóstico. (Pulitzer et al., 2009)

## **Caracterização imuno-histoquímica**

Dado o facto da caracterização histológica deste tumor ser pouco específica é necessária a análise imuno-histoquímica para estabelecer o diagnóstico. (Becker, 2010) A lesão tumoral apresenta positividade para marcadores epiteliais e neuro-endócrinos. (Pectasides et al., 2006) (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010)

Nos marcadores epiteliais podemos referir positividade para AE1/AE3, CAM 5.2, CK20, pan-citoqueratina, antigénio da membrana epitelial e BER-EP4.

De facto, a maioria dos CM (75-100%) são, pelo menos focalmente, positivos para CK 20 - mostrando tipicamente, um padrão paranuclear punctiforme (Sastre-Garau et al., 2009) (Pulitzer et al., 2009) (Wong & Wang, 2010) (Becker, 2010) que pode estender-se para o citoesqueleto –; e negativos para CK 7. (Wong & Wang, 2010) (Pulitzer et al., 2009) Raramente há positividade para CK 7 e negatividade para CK 20. (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Wong & Wang, 2010)

Nos marcadores neuro-endócrinos podemos referir positividade para neurofilamentos, enolase neuroespecífica, cromogranina, sinaptofisina, bombesina, somatostatina, peptídeo

intestinal vasoactivo e proconvertases PC1 / PC3 e PC 2.7. (Pectasides et al., 2006) (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010) Em relação à positividade para sinaptofisina verificou-se uma associação significativa entre baixa expressão (< 10% das células) e prognóstico favorável. (Fernández-Figueras et al., 2007)

O CM pode ainda mostrar positividade para CD 56, receptor KIT (CD 117) e, mais raramente, para CD 99 e deoxinucleotidil transferase (TdT). Contudo, é geralmente negativo para marcadores como o factor de transcrição tiroideu-1 (TTF-1), S100, vimentina e antigénio leucocitário comum (CD 45). (Fernández-Figueras et al., 2007) (Pulitzer et al., 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010)

Geralmente, são realizadas as identificações imuno-histoquímicas da citoqueratina 20 (CK 20), enolase neuroespecífica (ENS) - possuindo o primeiro marcador maior especificidade mas menor sensibilidade em relação ao segundo - antigénio leucocitário comum, factor de transcrição tiroideu-1 e vimentina. (Becker, 2010)

Convencionalmente, as linhagens celulares de CM são divididas nos tipos clássicos e variante de acordo com ausência/presença de marcadores neuro-endócrinos. Ambos os tipos são subdivididos em quatro subtipos de acordo com a morfologia das células e colónias celulares e a taxa de proliferação celular. (Fischer et al., 2010) (Kuwamoto, 2011)

## Patogénese

### Considerações moleculares no processo de oncogénese

Na patogénese molecular do CM teremos de considerar alterações genéticas e epigenéticas na base do desenvolvimento de mecanismos de evasão ao fenómeno apoptótico, auto-suficiência em termos de sinais de multiplicação celular, insensibilidade a factores inibidores do crescimento, capacidade replicativa ilimitada, potenciação da angiogénese e invasão tecidual/metastização, e processos de escape à vigilância imunológica. (Houben et al., 2009)

Apesar do(s) mecanismo(s) ainda não estar(em) completamente esclarecido(s), múltiplos estudos têm sido efectuados neste sentido. (Houben et al., 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010)

- Implicações de mecanismos moleculares envolvidos no crescimento celular

### Factores de crescimento / Receptores de factores de crescimento

Os receptores de factores de crescimento são proteínas transmembranares com domínios extra e intracelulares com actividade de tirosina cinase. As versões oncogénicas destes receptores estão associadas a dimerização constitucional e activação sem necessidade de ligação com o respectivo factor de crescimento. (Kumar et al., 2005)

No caso do CM, foi detectada uma mudança de base no exão 10 codificador do receptor para o factor de crescimento derivado das plaquetas  $\alpha$  (PDGF  $\alpha$ -R) conducente à substituição de aminoácido no codão 478. (Karthi & Sundram, 2008) (Houben et al., 2009)

(Wong & Wang, 2010) Contudo, permanece a hipótese de se tratar apenas de um polimorfismo. (Kartha & Sundram, 2008) (Houben et al., 2009)

Foram analisadas possíveis alterações no proto-oncogene KIT, receptor do factor das células tronco (SCF), envolvido no processo de oncogénese de vários tumores (e.g. tracto gastrointestinal e tecidos moles). (Kumar et al., 2005) (Houben et al., 2009) Contudo, apesar de frequentemente expresso, não foram detectadas mutações activadoras (Kartha & Sundram, 2008) (Houben et al., 2009) e a sua expressão não mostrou correlação com o grau de agressividade tumoral. (Kartha & Sundram, 2008) No entanto, quando avaliada a expressão do ligando deste receptor – SCF verificou-se que, apesar da baixa expressão na lesão tumoral, esta era significativa na vizinhança da mesma levantando a hipótese de existir um mecanismo de estimulação celular parácrino. (Kartha & Sundram, 2008)

### Proteínas transdutoras de sinal

Uma das vias intracelulares classicamente associada ao processo de multiplicação celular envolve as proteínas Ras/Raf/MEK/ERK, determinante nos processos de controlo do crescimento, diferenciação e sobrevivência celulares, podendo ser activada por múltiplos estímulos extracelulares. (Lassacher et al., 2008) (Becker, 2010) De facto, genes codificadores das proteínas Ras são os que mais frequentemente apresentam mutações em tumores na espécie humana (Lassacher et al., 2008), e recentemente, foram descritos em múltiplos tumores mutações da B-Raf. (Lassacher et al., 2008) (Houben et al., 2009) (Becker, 2010)

No caso do CM não se verificaram mutações em qualquer uma das proteínas da cascata descrita, apontando para um possível silenciamento da mesma. (Lassacher et al., 2008) (Helmbold et al., 2009) Também estudos de imuno-histoquímica mostraram que, apesar

do elevado índice mitótico e significativa expressão da proteína ERK esta geralmente encontra-se fosforilada e portanto, inactiva (Houben et al., 2009) (Becker, 2010)

Em relação à proteína Ras, apesar de não terem sido verificadas mutações activadoras dos genes codificadores da mesma, observou-se em alguns estudos (Popp et al., 2002) (Lassacher et al., 2008) um polimorfismo silencioso, mais concretamente, uma substituição de nucleótidos no codão 17 do gene Ha-Ras.

Outra via de sinalização relevante, também implicada nos processos de crescimento e sobrevivência celular, e activada pela proteína Ras, envolve a formação do 2º mensageiro lipídico fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfato (PIP3), uma proteína com actividade de cinase. (Houben et al., 2009) (Becker, 2010)

A proteína PTEN (homólogo da fosfatase e tensina), com actividade supressora tumoral e cujo gene codificador se localiza no braço longo do cromossoma 10, desfosforila a proteína PIP3, exercendo um efeito inibitório sobre a via de sinalização descrita. No caso do CM, os estudos efectuados indicaram que esta proteína está geralmente inactivada. De facto, verificou-se uma perda heterozigótica do cromossoma 10 ou do braço longo do mesmo. (Pectasides et al., 2006) (Houben et al., 2009) (Becker, 2010) (Wong & Wang, 2010). Raramente se verificou a perda de heterozigotia acompanhada da inactivação do segundo alelo. (Houben et al., 2009)

Relacionado com a via da PIP 3, tem interesse referir que o factor de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), cuja activação excessiva confere resistência celular aos agentes quimioterápicos e radioterapia, parece desempenhar um papel pouco revelante na patogénese do CM. (Fernández-Figueras et al., 2007)



➤ Implicações de mecanismos moleculares envolvidos na apoptose celular

O processo apoptótico é controlado pelas vias de sinalização intrínseca, mitocondrial, e extrínseca, iniciada por receptor. (Kumar et al., 2005) (Houben et al., 2009)

Um dos mecanismos reguladores da via intrínseca inclui as proteínas da família Bcl-2 com funções anti-apoptóticas que asseguram a protecção da célula do mecanismo de apoptose pela via mitocondrial. (Kumar et al., 2005)

Em estudos posteriores, a sobre-expressão destas proteínas foi verificada em 75% das lesões de CM (Schlagbauer-Wadl et al, 2000) (Houben et al., 2009), não se verificando correlação entre a expressão destas e o prognóstico. (Fernández-Figueras et al., 2007) (Houben et al., 2009) Através do recurso a sequências de oligonucleótidos anti-sense que interferiram negativamente na expressão da Bcl-2, verificou-se uma redução da massa tumoral, com um aumento significativo do índice apoptótico (de 2,4% para 4,6%). Contudo, quando usadas em ensaio de fase II a eficácia demonstrada foi significativamente inferior (Schlagbauer-Wadl et al, 2000) (Houben et al., 2009) (Wong & Wang, 2010)

Da família da proteína Bcl-2 inclui-se a proteína Mcl-1. Num estudo realizado, a maioria das amostras de CM estudadas apresentava elevados níveis de expressão da mesma. (Brunner et al., 2008)

Por fim, verificou-se sobre-expressão da survivina, proteína com funções anti-apoptóticas, em lesões de CM e também demonstrável em outros tumores e tecidos de origem embrionária/fetal. A expressão desta proteína associa-se a um comportamento tumoral mais agressivo. (Fernández-Figueras et al., 2007) (Houben et al., 2009) (Wong & Wang, 2010)

➤ Implicações de mecanismos moleculares envolvidos na angiogénese / invasão tecidual

O fenómeno de angiogénese suporta o crescimento tumoral, assegurando o aporte de nutrientes e oxigénio e as células endoteliais recém-formadas estimulam o crescimento de células tumorais pela secreção de factores de crescimento.

Se no início do crescimento tumoral o fenómeno de angiogénese não é significativo, num período temporal de meses a anos este adquire importância e algumas células tumorais parecem sofrer uma mudança fenotípica – mudança angiogénica. (Kumar et al., 2005) Na base desta mudança poderá estar uma mudança na expressão génica, e.g. aumentando a produção factor de crescimento vascular endotelial (VEGF) em resposta a um aumento do factor indutor da hipoxia (HIF-1). (Kumar et al., 2005) (Houben et al., 2009)

De facto, em lesões de CM verificou-se expressão de VEGF-A e VEGF-C, bem como do receptor VEGF-R2, embora em níveis baixos. (Karth & Sundram, 2008) (Brunner et al., 2008); não se conseguindo demonstrar activação da via do HIF-1. (Fernández-Figueras et al., 2007) Em tumores de maiores dimensões, os níveis de expressão foram superiores mas a diferença não foi estatisticamente significativa. (Brunner et al., 2008) (Houben et al., 2009)

Num outro estudo, a expressão de VEGF mostrou correlação estatisticamente significativa com a expressão de duas metaloproteinases – MMP (MMP 7 e MMP 10/2). De facto, as metaloproteinases e respectivos inibidores tecidulares desempenham um papel fundamental na disseminação metastática. No caso do CM, foram descritas correlações estatisticamente significativas entre a expressão elevada de MMP 1, MMP 3, MMP 7 e MMP 10 e o potencial de metastização. (Fernández-Figueras et al., 2007)

➤ Implicações de mecanismos moleculares envolvidos na regulação do ciclo celular

A proteína p53, codificada pelo gene supressor tumoral p53 localizado no cromossoma 17p13.1, detém uma multiplicidade de funções no controlo do ciclo celular, indução do processo apoptótico e reparação do DNA. (Kumar et al., 2005) (Becker, 2010) De facto, o gene p53 é um alvo frequente de mutações inactivadoras em múltiplos tumores. (Kumar et al., 2005) (Houben et al., 2009)

Em lesões de CM foram ocasionalmente verificadas mutações neste gene: num estudo efectuado, em 2 das 5 linhas tumorais CM foram encontradas alterações a este nível. (Gele et al., 2000) Evidências apontam também para o facto de algumas destas mutações serem caracteristicamente resultado da acção da radiação UV-B, assunto desenvolvido posteriormente. (Popp et al., 2002)

Também a fosfoproteína retinoblastoma (Rb), produto do gene RB, detém um papel crucial na regulação do ciclo celular, relacionando-se funcionalmente com a proteína p53. Quando hipofosforilada, encontra-se funcionalmente activa, bloqueando a proliferação celular através do sequestro e alteração da função dos factores de transcrição E2F que controlam a expressão génica essencial para a transição G1/S no ciclo celular. Pelo contrário, quando hiperfosforilada, funcionalmente inactiva, a multiplicação celular prossegue. (Kumar et al., 2005) (Houben et al., 2009)

No caso do CM, os estudos efectuados acerca de uma possível perda de função da pRB foram contraditórios e escassos, num destes verificou-se perda de heterozigotia do marcador D13S233 (13q14.3) localizado próximo do gene codificador da pRB1 em 18 de 24 amostras de CM analisadas. (Houben et al., 2009) (Becker, 2010)

As proteínas cuja expressão é induzida pela p53 incluem a p21 cuja função assenta na inibição de cinases dependentes de ciclina (CDK) e portanto, como outros inibidores de CDK's, previne a fosforilação da proteína RB. (Houben et al., 2009) (Becker, 2010)

Como inibidores de CDK's incluem-se para além da p21, a p27 e a proteína p16INK4a da família INK 4. (Becker, 2010) Este último grupo é codificado pelo locus INK4a-ARF e compreende as proteínas p14ARF e a já referida, p16INK4a que tem um efeito inibitório na degradação da p53. (Houben et al, 2009) (Becker, 2010)

Num estudo efectuado, verificou-se a hipermetilação do promotor da p14ARF em oito e do promotor da p16INK4a em uma das 19 amostras de MC analisadas. O estado de metilação do locus INK4a-ARF pode variar consoante o tipo de tumor: no caso do CM é comum a hipermetilação do promotor da p14ARF e rara a hipermetilação do promotor da p16INK4a. (Lassacher et al., 2008)

Da família das proteínas estrutural e funcionalmente relacionadas com a p53 incluem-se a p73 e a p63. Em relação à p73, num estudo realizado, verificou-se em uma das 10 amostras de CM estudadas a existência de uma mutação no codão 110 do exão 4 levando a uma redução ou perda de função da região terminal NH<sub>2</sub>. (Gele et al., 2000) A expressão da p63 correlacionou-se com o grau de agressividade tumoral, pois apesar de possuir uma função supressora tumoral, do gene codificador p63 derivam algumas proteínas ( $\Delta$ N p63) que podem actuar de um modo dominante-negativo em relação às proteínas p53 e p63. (Houben et al., 2009)

➤ Outras alterações cromossómicas/génicas

Numerosas anomalias cromossómicas foram reportadas. (Pectasides et al., 2006) Entre as mais comuns, presente em mais de 40% dos casos descritos e observada igualmente no melanoma, encontra-se a deleção do braço curto do cromossoma 1 (1p36). (Pectasides et al., 2006) (Wong & Wang, 2010)

A deleção do gene FHIT, supressor tumoral, na região 3p14.2 (Helmbold et al., 2009), bem como a perda de heterozigotia da banda 3p21 também foram descritas em casos de CM. (Pectasides et al., 2006) (Wong & Wang, 2010)

Outras anomalias cromossómicas encontradas incluem: perda de heterozigotia do 13; trissomia do 1, 6, 11 e 18 e deleção do 7. (Pectasides et al., 2006) (Wong & Wang, 2010)

## **Poliomavírus MCPyV**

Na sequência de evidências que apontavam para o facto do CM atingir preferencialmente indivíduos imunodeprimidos, como receptores de transplantes de órgãos ou indivíduos com uma deficiência imunitária de células T e.g. leucemia linfocítica crónica, levantou-se a hipótese de na base do processo de oncogénese estar uma infecção vírica. (Heath et al., 2008) (Houben et al., 2009) (Pulitzer et al., 2009) (Rockville MCC Group, 2009) (Johnson, 2010) (Kaae et al., 2010) (Fischer et al., 2010) (Zager et al., 2011) (Bhatia et al., 2011) Aliás, pode mesmo verificar-se, por vezes, uma regressão tumoral após melhoria na função imunológica. (Fischer et al., 2010) (Bhatia et al., 2011)

Assim, Feng et al. (2008), recorrendo à técnica de subtracção digital de transcriptoma, identificaram genoma viral, integrado em células tumorais, pertencente a um novo poliomavírus, denominado de poliomavírus das células Merkel (MCV ou MCPyV). (Feng et al., 2008)

### ➤ Caracterização da família *Poliomaviridae*

O primeiro poliomavírus foi identificado por Ludwik Gross em 1953, sendo reconhecido o seu potencial oncogénico em tumores das glândulas salivares em ratos. (Hausen, 2008)

Em 1971, são identificados os primeiros poliomavírus humanos BK e JC. Posteriormente, foram identificados, em secreções respiratórias de indivíduos saudáveis, os vírus KI, WU que parecem não exibir papel patogénico.

Mais tarde, em 2008, é descoberto o vírus das células Merkel, MCPyV, (Hausen, 2008) (Johnson, 2010) (Kuwamoto, 2011) e em 2010, são detectados mais três poliomavírus

humanos – poliomavírus humano 6, poliomavírus humano 7 e poliomavírus associado à tricodisplasia espinhosa (Schowalter et al., 2011) (Kuwamoto, 2011).

Foram também descobertos em humanos, os poliomavírus SV 40 e LPV, identificados em macacos. (Johnson, 2010)

Em termos de comparação filogenética, os vírus BK – agente da nefropatia associada a poliomavírus - e JC – implicado na leucoencefalopatia progressiva multifocal - e ainda o SV 40 – implicado em tumores renais nos macacos - estão intimamente relacionados. Enquanto que os vírus KI e WU não apresentam algumas das características dos primeiros poliomavírus conhecidos, o MCPyV distancia-se significativamente destes. (Hausen, 2008) (Johnson, 2010) (Bhatia et al., 2011)

Aliás, ao contrário dos vírus KI e WU que pertencem ao subgrupo SV 40 dos poliomavírus, o MCPyV é incluído no subgrupo dos poliomavírus murinos e está filogeneticamente mais próximo do poliomavírus do macaco verde africano (LPyV). (Hausen, 2008) (Bhatia et al., 2011)

### Análise do genoma viral

Sumariamente, os vírus incluídos na família *Poliomaviridae* caracterizam-se por serem pequenos, sem envelope, com cerca de 40-50 nm de diâmetro. Possuem cápside e dupla cadeia de DNA circular com 4700-5000 pares de bases.

Todos os vírus contêm no seu genoma uma região de controlo transcricional que regula, em direcções opostas, a transcrição dos genes precoces e tardios e que inclui a origem da replicação do DNA viral. (Hausen, 2008) (Houben et al., 2009) (Johnson, 2010) (Becker, 2010) (Schowalter et al., 2011)

Os genes precoces, transcritos no início da replicação do DNA, codificam as proteínas T pequena e grande (antígenos T pequeno e grande) envolvidas no processo de transformação

oncogénica referido posteriormente. Os genes tardios, VP1, VP2 e VP3, codificam proteínas estruturais, integrantes da cápside viral. (Hausen, 2008) (Johnson, 2010) (Becker, 2010) (Schowalter et al., 2011)

- Antígenos T

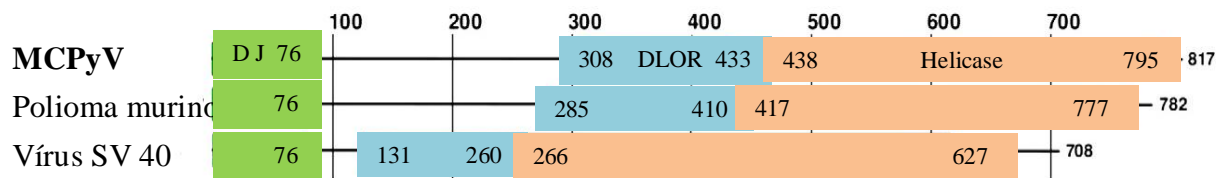
Os antígenos T correspondem a proteínas multifuncionais que, para além de regularem aspectos do ciclo de vida do vírus, estabelecem ligação com proteínas celulares forçando a progressão do ciclo celular. (Houben et al., 2009)

Para além dos antígenos T grande e pequeno existem outras isoformas de antígeno T que podem estar presentes e são específicas do vírus, como o antígeno T médio. (Kwun et al., 2009)

O antígeno T grande tem um papel na replicação e capacidade oncogénica viral. Detém funções de iniciação da replicação e actividade helicase, bem como a capacidade de se ligar às proteínas supressoras tumorais Rb e p53 modulando actividades celulares no sentido de forçar a progressão para a fase S do ciclo celular, processo essencial para explicar o potencial oncogénico dos poliomavírus. (Houben et al., 2009) (Johnson, 2010) (Houben et al., 2011)

Em relação à organização funcional desta proteína (Fig. 2) podemos considerar três domínios: o domínio J na região N-terminal, um domínio de ligação à origem de replicação e ainda, uma região C-terminal com actividade de helicase. A região intermédia entre o domínio J e o local de ligação à origem de replicação varia significativamente entre os vários poliomavírus e inclui zonas determinantes para os processos de transformação celular e oncogénicos, como o domínio de ligação à proteína Rb. (Harrison et al., 2011)



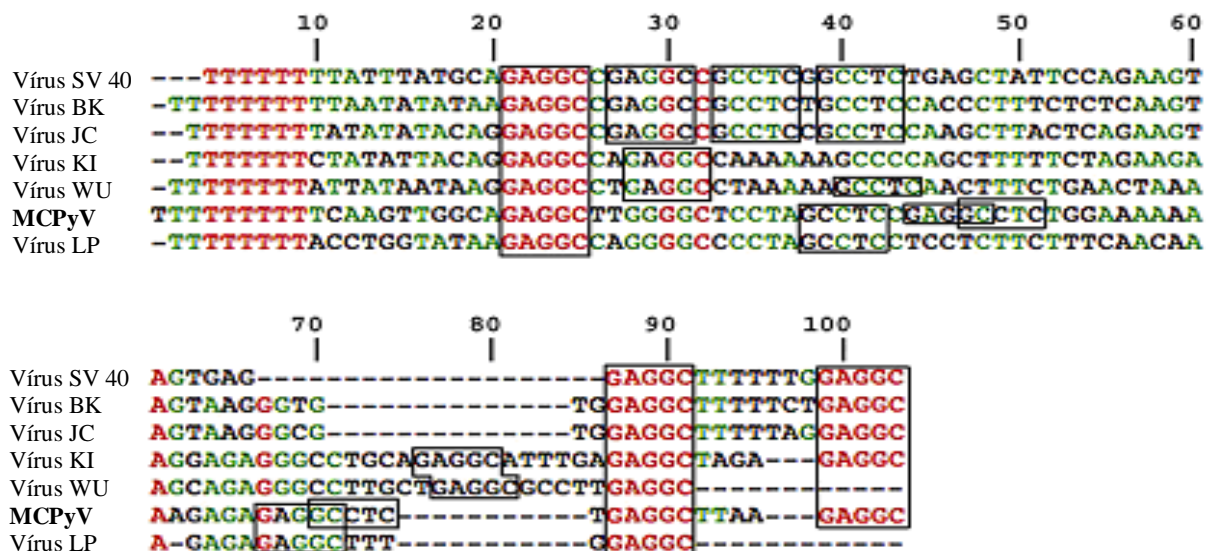


**Fig. 2** – Representação esquemática da estrutura funcional da região codificador do antígeno T grande em três poliomavírus. **Legenda** DJ (verde): Domínio J; DLOR (azul): Domínio de ligação à origem de replicação. Note-se o realce para o MCPyV.

Adaptada de Harrison et al. (2011).

Repetições de sequências de DNA GAGGC são consideradas as regiões centrais de origem da replicação do DNA viral que estabelecem ligação à zona correspondente no antígeno T grande (Fig. 3). No caso dos vírus BK e JC encontramos duas repetições da sequência GAGGC seguidas por uma repetição palindrômica de GCCTC; o vírus KI não tem nenhuma sequência GCCTC enquanto que o vírus WU tem apenas uma única sequência.

No caso do MCPyV existem dois elementos GCCTC não organizados de modo palindrômico. Este vírus é o único que detém duas repetições sobrepostas, bidirecionais, do elemento palindrômico GAGGCCTC que constituem locais de ligação ao antígeno T grande. (Kwun et al., 2009) (Johnson, 2010) (Harrison et al., 2011)



**Fig. 3** – Representação esquemática da sequência DNA na origem de replicação de vários poliomavírus. Estão realçadas as sequências GAGGC. Note-se o realce para o MCPyV.

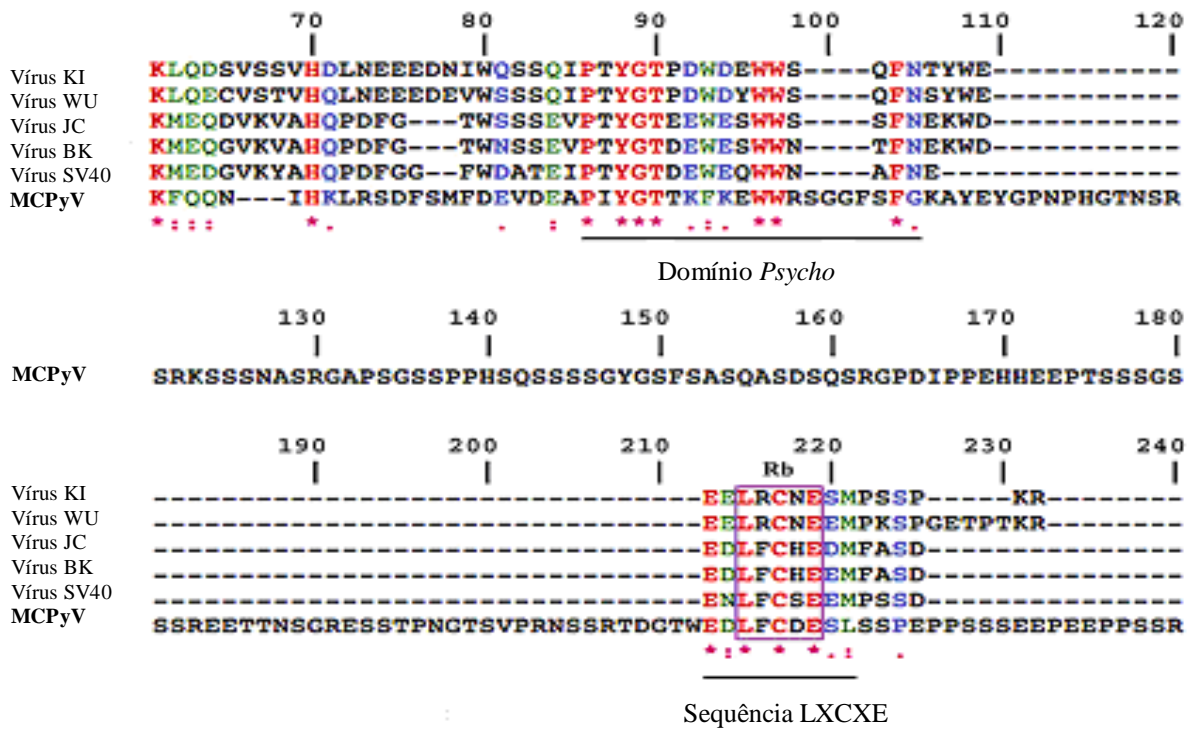
Adaptada de Johnson (2010).

Apesar da sequência proteica do antígeno T grande apresentar grande homologia no caso dos vírus BK e JC, o mesmo não se verifica nos vírus identificados mais recentemente: no caso dos vírus JC e WU é idêntica em cerca de 49% mas no MCPyV a percentagem de homologia em relação aos outros poliomavírus humanos reduz-se para cerca de 30%. (Johnson, 2010)

Os primeiros 100 aminoácidos de todos os antígenos T estão bem conservados e incluem o domínio J. (Kuwamoto, 2011)

O local de ligação à proteína Rb inclui um domínio *Psycho* que modula as actividades da mesma e uma sequência LXCXE, importante para o estabelecimento da ligação do antígeno à referida proteína (Fig. 4). No caso do MCPyV, o domínio *Psycho* e a sequência mencionada estão intervalados por 106 aminoácidos cuja função é desconhecida. (Johnson, 2010)

Os locais de ligação à proteína p53 e DNA compreendem várias sequências sobrepostas, moderadamente conservadas, com um grau de homologia de 54-56% entre os vírus BK e JC e o MCPyV. (Johnson, 2010)



**Fig. 4** – Representação esquemática do domínio de ligação do antígeno T grande à pRb em vários poliomavírus. Note-se o destaque para o MCPyV.

Adaptada de Johnson (2010).

Para além da ligação directa do antígeno T grande à origem de replicação, outros factores contribuem para a eficácia do processo de replicação. Neste sentido, o antígeno T pequeno promove a actividade do antígeno T grande. A presença de mutações no domínio de ligação do antígeno T pequeno, analisadas posteriormente, à proteína PA2 suprime esta função. (Kwun et al., 2009) (Feng et al., 2011)

- Proteínas da cápside e agnoproteína

A designação da família destes vírus como *Poliomaviridae* surgiu na sequência de estudos que comprovaram que poliomavírus murinos provocavam tumores em diversos tecidos em animais experimentalmente infectados pelos mesmos. De facto, a distribuição tecidual alargada dos receptores de entrada celular (gangliósidos) destes vírus nas células justifica o tropismo por vários tecidos. (Schowalter et al., 2011)

A constituição da cápside dos vírus BK e JC inclui 360 moléculas da proteína VP1, que constitui cerca de 70% do conteúdo proteico desta estrutura, organizadas em pentâmeros que circundam uma proteína central – VP2 ou VP3. A interacção da proteína VP1 com os resíduos de ácido siálico na superfície celular permite a entrada do vírus.

As sequências das proteínas VP1, à semelhança dos antígenos T, mostram maior homologia entre os vírus BK e JC, depois entre KIV e WUV e por fim, mais distanciado, MCPyV (Schowalter et al., 2011) (Kuwamoto, 2011)

Também localizado na região tardia, mais proximalmente, encontra-se o gene que codifica a agnoproteína, existente apenas nos vírus SV 40, BK e JC. Consiste numa proteína pequena, auxiliar, envolvida no ciclo replicativo viral e em processos responsáveis pela desregulação de mecanismos celulares, como o controlo do ciclo celular e reparação do DNA. (Khalili et al., 2005) (Kuwamoto, 2011)

### Potencial oncogénico dos poliomavírus

Todos os poliomavírus humanos estão altamente disseminados pela população, na maioria dos casos a infecção primária ocorre durante a infância. Dentro dos poliomavírus conhecidos apenas ao MCPyV foi atribuído um potencial oncogénico no Homem. (Hausen, 2008) (Duncavage et al., 2009) (Bhatia et al., 2011)

Em relação aos vírus BK e JC a infecção primária pode traduzir-se a longo prazo nos indivíduos afectados como condição de portador crónico - o vírus persiste no urotélio, a seroprevalência varia entre 44-88% na população adulta. Apesar de induzirem vários tumores quando infectados modelos animais, o seu papel carcinogénico em tumores humanos permanece controverso. (Houben et al., 2009) (Sastre-Garau et al., 2009) (Johnson, 2010)

Apesar dos vírus KI, WU e MCPyV terem sido encontrados em secreções do tracto respiratório, as percentagens de indivíduos com patologia infecciosa são baixas e não existem, até ao momento, evidências que comprovem um contributo etiológico destes vírus em doenças do foro respiratório. Ao contrário dos vírus BK e JC, os vírus KI e WU não foram detectados na urina ou no sangue. (Hausen, 2008) (Johnson, 2010)

Um aspecto a ressaltar será a possibilidade de poliomavírus animais poderem ser potenciais agentes oncogénicos em tumores humanos. De facto, vírus tipo polyoma, geralmente não estão envolvidos em processos oncogénicos nos seus hospedeiros nativos no entanto, poderão induzir a transformação celular e aparecimento de tumores em hospedeiros heterólogos. (Hausen, 2008)

Enquanto no hospedeiro natural, a infecção da célula hospedeira é seguida pela replicação do genoma viral com produção de partículas víricas e subsequente lise celular; no caso de hospedeiros heterólogos, as células são não permissivas, não ocorrendo produção de partículas víricas apesar de existir integração do genoma viral e expressão constitutiva dos antígenos T. (Sastre-Garau et al., 2009)

## **Associação MCPyV e Carcinoma de Merkel**

Todos os poliomavírus detêm capacidade de transformar células. (Johnson, 2010)

Como referido anteriormente, em 2008, é aplicada uma nova metodologia, a técnica de subtração digital de transcriptoma, pela equipa responsável pela primeira identificação do MCPyV. Sumariamente foram criadas livrarias de cDNA a partir de mRNA de células tumorais e subtraídas às sequências obtidas as pertencentes à espécie humana no intuito de estudar as restantes. Assim, das 382 747 sequências de cDNA, 2 395 apresentavam grande homologia com um poliomavírus conhecido – o poliomavírus do macaco verde africano (LPyV). Deste modo, uma das novas sequências obtidas, com cerca de 5300 pares de bases, foi sequenciada e identificada como pertencente ao genoma do novo poliomavírus humano – MCPyV. (Feng et al., 2008) (Zager et al., 2011) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011)

Posteriormente, a mesma equipa, no sentido de avaliar uma possível associação entre CM e infecção pelo MCPyV, investigou a existência de genoma viral em 10 amostras de CM, concluindo que oito (80%) continham DNA viral. Apenas cinco (8%) das 59 amostras obtidas de tecidos de diversas zonas do corpo e quatro (16%) das 25 amostras de pele normal e tumores não CM apresentavam DNA viral no genoma das células tumorais. (Feng et al., 2008) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011)

Concluiu-se ainda que o genoma do MCPyV se apresentava integrado no DNA das células tumorais de acordo com um padrão monoclonal em seis dos oito casos positivos para MCPyV. Aliás, num destes casos foi identificado um padrão idêntico tanto no tumor primário como nas lesões metastáticas indiciando que a infecção viral e integração do genoma vírico nas células hospedeiras ocorreriam antes da expansão clonal das mesmas. (Houben et al., 2009) (Sihto et al., 2009) (Becker et al., 2009) (Johnson, 2010) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011)

Tais dados fortaleceram a associação suspeita. Estudos posteriores corroboraram esta relação, na maioria a prevalência de MCPyV em lesões de CM ronda os 70-80% (Tabela I). (Kuwamoto, 2011)

Note-se a maior prevalência deste vírus em amostras de CM de pacientes da América do Norte em relação a pacientes australianos. Na Europa, em geral, a taxa de detecção do vírus no CM varia entre 77-85%. (Helmbold et al., 2009)

**Tabela I** – Prevalência de MCPyV no CM por área geográfica. Adaptada de Kuwamoto (2011).

<i>Área geográfica</i>	<i>Estudo</i>	<i>Prevalência de MCPyV em amostras de CM</i>
<u>América do Norte</u>	Feng et al. (2008)	8/10 (80%)
	Garneski et al. (2009)	11/16 (69%)
	Paulson et al. (2008)	13/22 (59%)
	Duncavage et al. (2009)	22/29 (76%)
	Bhatia et al. (2010)	17/23 (74%)
	Loyo et al. (2010)	6/7 (87%)
	Carter et al. (2009)	24/31 (77%)
<u>Europa</u>	Becker et al. (2009)	45/53 (85%)
	Helmbold et al. (2009)	90/98 (92%)
	Houben et al. (2010)	43/50 (86%)
	Sastre-Garau et al. (2009)	10/10 (100%)
	Sihto et al. (2009)	91/114 (80%)
<u>Áustrália</u>	Garneski et al. (2009)	5/21 (24%)
<u>Ásia Oriental</u>	Katano et al. (2009)	6/11 (55%)
	Kuwamoto et al. (2011)	20/26 (77%)
	Woo et al. (2010)	7/7 (100%)

Um dos aspectos, observado em vários estudos, a favor do papel do vírus MCPyV no processo de oncogénese foi o facto de pacientes com CM com positividade para MCPyV apresentarem títulos de anticorpos anti-MCPyV classe IgG mais elevados em relação a indivíduos infectados pelo MCPyV mas sem lesões tumorais. (Carter et al., 2009) (Paulson et

al., 2010) (Kuwamoto, 2011) Um aspecto a ressaltar é a ausência de associação entre a presença de CM e a positividade para anticorpos dirigidos contra outros poliomavírus indicando que estes pacientes não estão globalmente susceptíveis para infecções e/ou reactivações destes vírus. (Carter et al., 2009)

Num dos estudos efectuados foram identificados anticorpos dirigidos contra o antígeno T grande. De facto, ao contrário das proteínas da cápside, altamente susceptíveis à indução de uma resposta imune humoral, a oncoproteína – antígeno T grande – não está presente nas partículas virais, e é expressa, no núcleo, apenas após entrada e integração do genoma viral nas células hospedeiras. Deste modo, a presença destes anticorpos é mais específica para CM.

Neste estudo, nenhum dos pacientes cuja amostra tumoral foi negativa para MCPyV apresentava anticorpos séricos contra o antígeno T grande, sugerindo outras vias oncogénicas na base deste tumor. (Paulson et al., 2010)

Num outro estudo verificou-se que em sete de 31 pacientes com CM, apesar de não ter sido detectado DNA viral nas células neoplásicas, foram identificados anticorpos contra a proteína da cápside VP1. Os autores levantam a hipótese do vírus ter um papel na iniciação do processo tumoral não sendo necessário para a manutenção do fenótipo neoplásico, o que poderia justificar a ausência do vírus em células não positivas para MCPyV, ou simplesmente o envolvimento de outros processos oncogénicos. (Carter et al., 2009)

Em relação à resposta serológica Paulson et al. (2010) verificaram que as alterações dos níveis dos anticorpos variavam de acordo com a evolução da doença: maiores repercussões no estado geral dos pacientes correspondiam a títulos de anticorpos mais elevados, sugerindo que os mesmos não desempenham funções protectoras.

Por outro lado, o *turnover* dos anticorpos era acelerado, sugerindo uma instabilidade na população das células B. Excluindo a quimioterapia como causa deste fenómeno, estas



variações poderiam ser explicadas com base em alterações na carga antigénica e consequentemente em alterações na estimulação dos linfócitos B. Os mesmos autores verificaram em três casos que a detecção de metástases foi precedida, em 1-6 meses, por um aumento do título de anticorpos anti-antigénio T grande.

Um dos aspectos abordados nos vários estudos efectuados é a determinação da carga vírica em amostras de CM. O número de cópias virais por célula varia imenso entre casos e entre estudos. Enquanto na maioria, os níveis de MCPyV são facilmente detectados, desconhecem-se as razões porque um considerável número de casos aparentemente mostra uma carga viral muito inferior a uma cópia por célula, levantando-se a hipótese de nestes casos o vírus ser apenas um “mero passageiro”. (Kuwamoto, 2011)

Outra hipótese colocada é o vírus desempenhar um papel decisivo para iniciação do processo oncogénico mas posteriormente ocorrer uma “perda” do genoma viral mas é refutada pela observação de uma heterogeneidade da quantidade de cópias virais por célula na mesma amostra tumoral. De facto, tal “perda” seria acompanhada de uma distribuição uniforme das cópias virais por célula. (Bhatia et al., 2010)

➤ Alterações moleculares decorrentes da infecção viral

Integração do DNA viral. Mutações antigénio T grande – assinatura molecular

A integração cromossómica é uma característica comum nos processos de oncogénese viral. Pode resultar na alteração da estrutura funcional de genes virais, criação de proteínas de fusão entre vírus-célula hospedeira ou desregulação da expressão de oncogenes ou genes supressores tumorais da mesma. (Johnson, 2010)

No caso do MCPyV, o aspecto mais importante no processo de integração do DNA viral é o facto deste ser clonal. A integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira

constitui um evento inicial no processo de oncogénese. (Houben et al., 2009) (Sastre-Garau et al., 2009) (Johnson, 2010) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011)

De facto, não se verificou dano ou desregulação genómica na célula hospedeira (mutagénese insercional) e na análise de amostras de tumor de vários pacientes verificou-se que o local genómico de integração do vírus era diferente de indivíduo para indivíduo. (Houben et al., 2009) (Sastre-Garau et al., 2009) (Johnson, 2010) (Houben et al., 2010) (Kuwamoto, 2011)

Uma característica central do genoma viral integrado, que lhe confere potencial oncogénico, é o facto das sequências codificadoras do antígeno T apresentarem mutações – assinatura molecular - que inactivam a função de helicase (domínio helicase na região 3') da proteína codificada. Deste modo, há uma perda da capacidade de replicação viral, evitando assim, a morte da célula hospedeira e potenciando a transformação oncogénica. (Johnson, 2010) (Feng et al., 2011) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011)

Após estudo das características moleculares do MCPyV em amostras de CM, secreções respiratórias, urina e sangue recolhidas dos mesmos pacientes verificou-se a presença destas mutações apenas em células da lesão primária e em poucas amostras sanguíneas (segundo os autores, devido à presença de células metastáticas) o que indicia uma especificidade destas alterações genómicas em relação ao CM. (Kuwamoto, 2011)

As sequências de DNA viral integrado mostram um padrão recorrente, com conservação do antígeno T pequeno e região 5' do antígeno T grande. (Sastre-Garau et al., 2009) (Houben et al., 2010) No entanto, a presença de codões stop prematuros em posição 3' em relação ao local codificador do domínio de ligação à proteína Rb resulta na transcrição da proteína antígeno T grande truncada. Tal facto irá resultar na perda do domínio 3' da mesma.

(Nakamura et al., 2010) (Johnson, 2010) Neste processo o domínio de ligação à p53 pode ser afectado. (Johnson, 2010) (Houben et al., 2010) (Houben et al., 2011) Desconhece-se ainda, se estas mutações ocorrem antes ou depois da integração do genoma viral na célula hospedeira. (Houben et al., 2010)

Deste modo, apesar da presença desta assinatura molecular se traduzir na perda da capacidade replicativa, o domínio de ligação à proteína Rb é conservado e portanto, como descrito posteriormente, o potencial oncogénico do vírus está preservado. (Nakamura et al., 2010)

A partir da transferência de sequências de gene codificador do antígeno T grande mutado para células em cultura, foi possível observar a localização da expressão da oncoproteína a partir de um sinal de localização nuclear. (Nakamura et al., 2010)

Deste modo, verificou-se que a maioria das sequências de antígeno T grande derivadas de amostras de CM apresentava codões stop em localização 3' em relação ao sinal de localização nuclear. Em algumas sequências foram detectadas mutações em localização 5' em relação ao mesmo sinal (Nakamura et al., 2010), permanecendo a dúvida se estas estipes contribuem para o processo de oncogénese ou correspondem apenas a vírus “passageiros”. (Kuwamoto, 2011)

Aliás, em alguns estudos verificou-se mesmo a ausência destas mutações, não podendo excluir-se a presença de outras alterações no genoma viral em locais determinantes para a sua capacidade replicativa. (Laude et al., 2010) (Kuwamoto, 2011)

Neste âmbito, foi identificada uma sequência de 71 pares de bases na região central de origem da replicação, local de ligação do antígeno T grande, na qual foram estabelecidos três domínios. Nesta sequência estavam contidas repetições de pentanucleótidos, sendo que quatro são cruciais no processo de replicação viral, caso apresentem alterações este mecanismo é

prejudicado. Aliás, numa estirpe tumoral identificada em células tumorais foi verificada uma disrupção numa destas sequências, com conseqüente alteração na ligação do antígeno T grande e portanto, inibição do processo de replicação. Tal facto sugere que as mutações nos antígenos T grandes poderão não ser a única assinatura molecular. (Kwun et al., 2009) (Laude et al., 2010) (Kuwamoto, 2011)

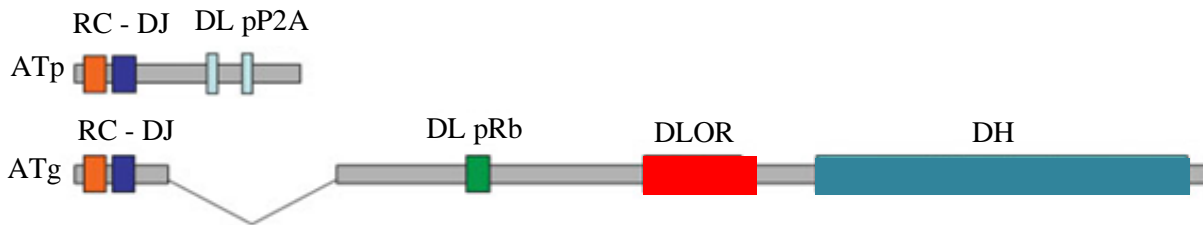
Por outro lado, estudos recentes sugerem que mutações idênticas às descritas inicialmente são encontradas tanto em células tumorais como em células adjacentes não tumorais, resultando daí a necessidade de maior investigação no sentido de identificar a relevância patogénica destas alterações genómicas. (Bhatia et al., 2010)

#### Papel dos antígenos T no processo de oncogénese

A expressão dos antígenos T (Fig. 5) ocupa um papel fundamental no processo de oncogénese viral. (Sastre-Garau et al., 2009) (Nakamura et al., 2010) (Feng et al., 2011) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011) Através do silenciamento experimental dos mesmos, em células de CM positivas para MCPyV, verifica-se uma cessação da multiplicação e crescimento celulares ou mesmo, a morte da célula. Deste modo, o ciclo celular é interrompido na fase G1, provavelmente devido a uma actividade reduzida das proteínas E2F, importantes na transição G1-S. A actividade destas é regulada por proteínas do grupo da pRb as quais na forma hipofosforilada se ligam à proteína E2F inibindo a sua transcrição. (Nakamura et al., 2010) (Houben et al., 2011) (Bhatia et al., 2011)

Note-se que o fenómeno de morte celular nestes casos não corresponde a um processo clássico de apoptose: as células entram num mecanismo de autofagia – auto destruição com envolvimento da maquinaria lisossómica. (Nakamura et al., 2010) De acordo com estes resultados, deduz-se que a manutenção do fenótipo neoplásico, e a própria sobrevivência das

células infectadas e transformadas por este vírus, depende da expressão destes antígenos. (Nakamura et al., 2010) (Kuwamoto, 2011)



**Fig. 5** – Esquema dos principais domínios funcionais dos antígenos T grande (ATg) e pequeno (ATp). **Legenda** RC – DJ: região conservada, domínio J; DL pP2A: domínio de ligação à proteína P2A; DL pRb: domínio de ligação à pRb; DLOR: domínio de ligação à origem de replicação; DH: domínio helicase

Adaptada de Sastre-Garau et al. (2009).

Especificamente, os antígenos T sinalizam e interferem com o funcionamento de proteínas celulares supressoras tumorais e envolvidas na regulação do ciclo celular – p53, pRb, proteína fosfatase 2A (PP2A) e Bub 1. (Wong & Wang, 2010) (Houben et al., 2011) (Sihto et al., 2011) (Bhatia et al., 2011) Mais concretamente, a inativação das proteínas supressoras tumorais pRb e p53 pelo antígeno T grande e a PP2A pelo antígeno T pequeno constituem etapas importantes no processo de oncogénese. (Houben et al., 2011)

A interacção entre o antígeno T grande e a proteína Rb é essencial para a progressão do ciclo celular das células de CM positivas para MCPyV. (Houben et al., 2011) (Sihto et al., 2011)

Num estudo mais recente verificou-se que o silenciamento experimentalmente induzido do gene codificador do antígeno T grande pode ser revertido pela introdução de um

gene ectópico codificador do mesmo mas não pelo mesmo gene apresentando alterações no domínio codificador do local de ligação à proteína Rb e ainda, que o crescimento de células de CM, positivas para MCPyV, pode ser inibido apenas por interferência com o referido domínio. (Houben et al., 2011)

Para além do domínio de ligação à proteína Rb, o genoma do MCPyV codifica também um domínio de ligação do antígeno T grande à proteína p53. Como referido anteriormente, esta região está geralmente truncada. (Sihto et al., 2011)

De facto, as mutações na proteína p53 são praticamente exclusivas em tumores negativos para proteína Rb ou antígeno T grande sugerindo que alterações na p53 ocorrem no processo de oncogénese de CM não associados a infecção pelo MCPyV. (Sihto et al., 2011) Contudo, uma proteína p53 activa pode conduzir à morte celular em resposta à presença de oncoproteínas virais ou celulares e deste modo, à eliminação de células tumorais infectadas, colocando a hipótese de existirem mecanismos virais supressores desta proteína. (Bhatia et al., 2011)

De referir ainda, a existência de um domínio do antígeno T grande que interage com uma proteína citoplasmática, hVam6p (também designada Vps39), componente de um complexo envolvido na fusão endossoma-lisossoma. Esta interacção provoca uma translocação da referida proteína do citoplasma, onde se encontra normalmente, para o núcleo e corpos perinucleares. Assim, a antagonização da capacidade da hVam6p na indução do processo referido, levanta a possibilidade desta proteína poder modular a replicação viral. (Feng et al., 2011)

Em relação às acções do antígeno T pequeno, algumas considerações em relação à proteína P2A pertencente a uma família de proteínas que formam heterotrímeros

compreendendo um core enzimático, contendo as subunidades C (catalítica) e A (estrutural) a qual estabelece ligação a uma subunidade B (reguladora). A função destas subunidades baseia-se na regulação das vias de sinalização celular ao oporem-se à actividade de cinases sinalizadoras, envolvidas em processos de sobrevivência celular, regulação do ciclo, resposta aos danos no DNA, e ainda, mecanismos de desenvolvimento embrionário. (Sastre-Garau et al., 2009) Reconhece-se o envolvimento desta proteína na via Akt-mTOR detendo funções de desfosforilação do resíduo T308 da cinase Akt, envolvida em processos de transformação e sobrevivência celulares. (Andrabi et al., 2007)

A função do antigénio T pequeno baseia-se na competição pela ligação à subunidade A da PP2A, substituindo a subunidade B, e portanto, na alteração da actividade do complexo AC. (Sastre-Garau et al., 2009) Deste modo, via alteração da função da PP2A, irão ocorrer fosforilações associadas ao crescimento por estimulação da via Akt-mTOR. (Andrabi et al., 2007) (Bhatia et al., 2011)

Por outro lado, a proteína PA2 detém ainda funções na manutenção das adesões intercelulares e na regulação da dinâmica do citoesqueleto, mais concretamente a nível dos filamentos intermediários. Deste modo, ao alterar a função desta proteína, o antigénio T pequeno interfere com estes mecanismos, induzindo uma perda da polaridade celular, passo essencial no processo de oncogénese. (Sastre-Garau et al., 2009) (Bhatia et al., 2011)

Em conclusão, em cerca de 77-84% das células de amostras de CM verifica-se:

- ✓ Presença de DNA viral de MCPyV integrado no genoma celular;
- ✓ Elevado número de cópias virais;
- ✓ Expressão da oncoproteína antigénio T grande;
- ✓ Expressão da pRb;
- ✓ Associação a uma resposta serológica significativa específica para o vírus MCPyV.

➤ Implicações histológicas e clínicas da infecção por MCPyV

Reflexo da infecção viral a nível histológico

A nível histológico, as células tumorais MCPyV positivas ou negativas parecem ser indistinguíveis. (DeCaprio, 2009) (Kuwamoto, 2011) No entanto, são apontadas diferenças por alguns autores. (Katano et al., 2009) (Kuwamoto et al., 2011)

Num dos estudos efectuados são registadas diferenças estatisticamente significativas: as células tumorais positivas para MCPyV mostram uma morfologia típica com núcleos vesiculares e redondos enquanto que células tumorais negativas para MCPyV apresentam morfologias variadas com núcleos poligonais e citoplasma claro. O grau de infiltração linfocítica não foi significativamente diferente. (Kuwamoto et al., 2011)

As diferenças morfológicas apontadas são consideradas um reflexo de diferenças biológicas entre os CM MCPyV positivos e negativos. Apesar do mecanismo biológico permanecer pouco claro, alterações cromossómicas numéricas e estruturais poderão contribuir para tal. (Paulson et al., 2009) (Katano et al., 2009) (Kuwamoto et al., 2011) Num estudo realizado, verificou-se que as células tumorais positivas para MCPyV apresentavam menos deleções do que as células negativas para o vírus, à excepção do braço cromossómico 19q, ausente na maioria das células MCPyV positivas. (Paulson et al., 2009)

Em relação à imuno-histoquímica são relatadas diferenças entre células positivas e negativas para MCPyV. Verificou-se que a expressão de CK 19 foi mais prevalente, cerca de duas vezes, em células negativas para o vírus; e o nível de expressão de CK 20 foi semelhante independentemente da presença de MCPyV. Foram também detectadas diferenças na expressão da proteína transmembranar da família dos receptores com actividade tirosina cinase – CD 117 – a qual, foi mais prevalente, cerca do dobro, em células positivas para MCPyV. (Andres et al., 2011)



Num estudo recente as conclusões obtidas foram contrárias aos dados anteriores. Após análise de linhagens celulares pertencentes aos tipos clássico e variante, verificou-se que uma linhagem celular com aparência morfológica clássica era negativa para MCPyV demonstrando que a infecção vírica nas células tumorais não seria necessariamente sinónimo deste fenótipo. Aliás, as conclusões do estudo estendem-se à relação entre o número de cópias víricas por célula e a expressão de marcadores neuro-endócrinos e morfologia das linhagens celulares mostrando não existir correlação entre estes. (Fischer et al., 2010)

#### Reflexo da infecção viral a nível clínico/prognóstico

Vários factores clínicos são correlacionados com a presença de infecção pelo MCPyV. (Sihto et al., 2009) (Bhatia et al., 2010) (Handschel et al., 2010)

Num estudo realizado verificou-se que CM positivos para MCPyV apresentavam maior tendência para localização nas extremidades e menor probabilidade de invasão linfática ao diagnóstico. (Sihto et al., 2009) Apesar de descrita uma correlação entre a quantidade de DNA viral e a idade dos pacientes, verificando-se maior abundância viral em doentes mais jovens, tal não se verifica em relação a factores como sexo, localização primária do tumor e presença de disseminação linfática. (Bhatia et al., 2010)

Numa publicação recente é avaliada a evolução clínica de 44 pacientes com CM. De acordo com as conclusões, não foi possível estabelecer uma correlação significativa entre a presença de MCPyV e o aparecimento de metástases. (Handschel et al., 2010)

A influência da presença de MCPyV no prognóstico destes pacientes tem sido uma área de grande investigação e controvérsia. (Handschel et al., 2010) (Zager et al., 2011)

A relação entre a presença de MCPyV e a sobrevivência é encontrada em vários estudos. (DeCaprio, 2009) (Sihto et al., 2009) (Kaae et al., 2010) (Bhatia et al., 2010) (Sihto

et al., 2011) Num destes verificou-se que pacientes com tumores positivos para MCPyV apresentavam sobrevivências superiores (45% aos 5 anos) em relação a pacientes com tumores negativos para MCPyV (15% aos 5 anos). Os mesmos autores sugerem que a correlação entre a infecção vírica e o melhor prognóstico poderá estar relacionada com o facto da expressão de oncogenes virais induzir e/ou promover o desenvolvimento de neoplasias com menor número de anomalias cromossómicas nas células hospedeiras ou, ainda, a expressão dos oncogenes virais poderá perturbar vias de sinalização na célula hospedeira, mais concretamente a nível da vigilância imunológica, tornando, deste modo, as lesões tumorais menos agressivas. (DeCaprio, 2009)

Bhatia et al. (2010) distinguiram dois subgrupos de CM: elevada carga viral – 0,06-1,2 cópias por célula – e baixa carga viral/ausência de genoma viral. Se no primeiro, foram detectadas por imuno-histoquímica significativa expressão de pRb e TdT e menor expressão de p53, bem como uma tendência para sobrevivências médias maiores (86 meses), no segundo grupo não foi detectada a expressão das referidas proteínas e verificou-se uma tendência para sobrevivências menores (20 meses).

Num outro estudo, com conclusões similares, verificou-se ainda que no subgrupo com maior carga viral, a expressão de antigénio T grande era superior. (Bhatia et al., 2010) A expressão deste antigénio é apontada como um factor de prognóstico favorável. (Sihto et al., 2011)

Em relação à expressão da proteína Rb, encontram-se conclusões diferentes. Num estudo, em todas as 50 amostras de CM analisadas (positivas para MCPyV – 86% - e negativas para MCPyV – 14%) verificou-se a expressão de pRb, sugerindo que a abundância viral não estaria correlacionada com o nível de expressão de pRb e que a inactivação desta proteína seria um processo universal em todos os casos de CM. (Houben et al., 2010)

Vários marcadores de infecção viral, incluindo a presença de DNA de MCPyV em células mononucleares no sangue periférico, anticorpos contra MCPyV e ainda, invasão intratumoral por linfócitos CD8 + têm sido associados ao prognóstico. (Zager et al., 2011)

## **Radiação Ultravioleta**

Como referido, vários estudos apontam para uma associação entre a infecção pelo MCPyV e o desenvolvimento do CM, com múltiplas evidências comprovando a existência de DNA viral integrado em células tumorais. (Sastre-Garau et al., 2009) (Duncavage et al., 2009) (Sihto et al., 2009) (Houben et al., 2009) (Becker et al., 2009) (Helmbold et al., 2009) (Katano et al., 2009) (Kuwamoto, 2011)

Alguns aspectos ficam ainda por esclarecer quanto ao papel do vírus no processo de oncogénese e possível envolvimento de outros co-promotores na carcinogénese. A carga vírica entre células tumorais varia consideravelmente entre casos e entre estudos, sendo detectadas, em número significativo, células tumorais cuja carga vírica é muito baixa ou mesmo inexistente. (Johnson, 2010) (Kuwamoto, 2011)

Também o longo intervalo de tempo entre a exposição ao vírus (antes dos 30 anos) e a idade média de desenvolvimento de lesões tumorais (cerca dos 70 anos) sugere o envolvimento de outros fenómenos genéticos no processo de oncogénese. (Carter et al., 2009) Aliás, foi demonstrado em estudos posteriores, baseados nos processos de oncogénese mediados por adenovírus e poliomavírus, que a dependência das células transformadas em relação à expressão das oncoproteínas virais diminuiu ao longo do tempo, mantendo-se o fenótipo oncogénico apesar da diminuição da expressão viral. Tal facto poderá ser explicado pela ocorrência de alterações genéticas subsequentes que “contornam” a diminuição da influência vírica. (Laude et al., 2010)

Por outro lado, a presença de MCPyV é documentada em tecidos de indivíduos saudáveis. Loyo et al. (2010) identificaram baixos níveis de DNA viral em vários tecidos humanos (ligeiramente mais elevados na saliva, tracto digestivo alto, vias aéreas superiores) ao contrário dos elevados níveis encontrados em amostras de CM.

Tais factos sugerem que a mera presença de infecção pelo MCPyV é insuficiente para induzir um processo de oncogénese. Mais, Schowalter et al. (2010) mostraram que o DNA de estirpes de MCV isoladas de vários tecidos humanos é semelhante ao de estirpes isoladas de amostras de CM refutando a hipótese da existência de subtipos de MCP envolvidos exclusivamente no processo de carcinogénese.

De facto, estudos serológicos mostraram que a maioria dos adultos já esteve exposta ao vírus, demonstrando-se a presença de anticorpos contra a proteína da cápside VP1 em 46-88%, observação consistente com a detecção de baixos níveis do vírus em indivíduos sem CM. Aliás, vários estudos verificaram a existência de anticorpos contra MCPyV em cerca de 20,5% em crianças com idade entre 1-5 anos e 43% entre 2-5 anos. Estes resultados apontam para uma ocorrência da infecção precocemente, na infância, com poucos indivíduos a desenvolverem CM mais tarde, sugerindo a implicância de outros factores. (Kaae et al., 2010) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011)

Uma breve referência ao facto de vários estudos reportarem a existência de DNA de MCPyV em outros tumores que não CM especialmente a nível hematológico.

Toracchio et al. (2010) demonstraram a presença de DNA viral em 10 de 152 (6,6 %) amostras de linfomas não-Hodgkin e em três de 44 (6,8 %) amostras de linfomas de Hodgkin, verificando igualmente a presença de genoma viral em amostras de gânglios linfáticos não envolvidos em processos neoplásicos. Deste modo, os autores avançam a hipótese deste vírus apresentar um linfotropismo. Também Shuda et al. (2009) e Koljonen et al. (2010) referem que pacientes com CM têm um risco acrescido de apresentarem neoplasias primárias e secundárias, particularmente leucemia linfocítica crónica. Aliás, Shuda et al. (2009), no sentido de esclarecer uma possível relação etiológica, quantificaram o DNA viral em amostras de LLC, verificando que os níveis do mesmo eram significativamente inferiores aos apresentados em células de CM.

Como referido anteriormente a exposição à radiação ultravioleta (UV) é apontado como factor de risco para o desenvolvimento de CM, concorrendo como factor etiológico no processo de carcinogénese.

De facto, a incidência desta lesão tumoral é superior em indivíduos de raça branca, idosos, afectando predominantemente áreas cutâneas foto-expostas e verificando-se diferenças geográficas em relação à prevalência tumoral. (Heath et al., 2008) (Houben et al., 2009)

Aliás, vários autores reportam a existência de casos de CM metácrónos/síncronos com outras neoplasias cutâneas comprovadamente associadas à exposição UV, nomeadamente o carcinoma espinhocelular (CEC). (Kaae et al., 2010) (Calzavara-Pinton et al, 2010)

Um dos aspectos indicativos de dano ao material genómico pela exposição a radiação UV-B são as substituições nucleotídeas  $C \rightarrow T$  e  $CC \rightarrow TT$  no gene p53. (Calzavara-Pinton et al, 2010) Neste sentido, Popp et al. (2002) analisaram os perfis genómicos do CEC e do CM, verificando mutações no gene p53 em quatro de cinco amostras de CEC (duas das quais correspondiam a substituições  $C \rightarrow T$ ) e em duas das seis amostras de CM (uma das mutações no codão 278, um local alvo de mutações do p53 em carcinomas cutâneos). Tais dados corroboram a hipótese da radiação UV-B actuar como agente mutagénico no desenvolvimento do CM.

No mesmo estudo, os autores avaliaram a existência de outras mutações especificamente associadas à radiação UV-B nomeadamente, substituições  $CC \rightarrow TT$  no codão 12 dos genes Ha e KI-Ras. (Popp et al., 2002) Nas amostras de CEC apenas numa foram detectadas e em nenhuma das de CM, contudo foi identificada nestas uma substituição nucleotídea no codão 27 do gene Ha- Ras, similar à descrita anteriormente no codão 12.

Dados recentes apontam que a radiação UV-A, embora com menor importância, também esteja envolvida na génese das referidas mutações. (Calzavara-Pinton et al., 2010)

Foram ainda, identificadas duas áreas de instabilidade genómica no CM e CEC – ganho de material na região 8q (também verificada no melanoma cutâneo) e perda na região 4p. Os autores apontam como possíveis causas de perdas e ganhos de material cromossómico a acção de espécies reactivas de oxigénio, especulando uma possível relação causal com a radiação UV-A. (Popp et al., 2002)

Num estudo retrospectivo, envolvendo um grupo de pacientes com psoríase submetidos a um esquema terapêutico de psoraleno e fotoquimioterapia com radiação UV-A, verificou-se o desenvolvimento de CM em três dos 1380 (0,2 %) pacientes. Apesar dos autores apresentarem outras causas subjacentes ao desenvolvimento de CM nestes pacientes – exposição a outros potenciais agentes carcinogénicos usados no tratamento da psoríase – concluem que o tratamento a longo prazo com elevadas doses de UV-A poderá aumentar o risco desta neoplasia. (Calzavara-Pinton et al, 2010)

Alguns autores vão mais longe, como Nakamura et al. (2010), e estabelecem uma possível relação entre a acção da radiação UV e a infecção pelo MCPyV, nomeadamente a nível da actividade mutagénica da primeira no genoma viral, mais especificamente a nível do gene codificador do antigénio T grande.

Também no sentido de esclarecer um possível papel da radiação UV na regulação da expressão génica viral Mogha et al. (2010), num ensaio laboratorial, avaliaram a actividade transcricional do promotor precoce do MCPyV após 5 horas de exposição a radiação UV, verificando que o nível de indução do promotor estava directamente relacionado com a dose de radiação e demonstrando, deste modo, que a exposição à radiação solar tem impacto nos níveis de mRNA de MCPyV.

## **Estadiamento**

Na primeira abordagem ao doente com CM, geralmente este diagnóstico não é colocado nas primeiras hipóteses. O índice de suspeição clínica aumenta na presença de uma lesão cutânea – nódulo ou pápula, menos comumente placa - de crescimento rápido, indolor, com coloração vermelho-azulada que se apresenta em áreas foto-expostas, num indivíduo imunodeprimido ou idoso. (Rockville MCC Group, 2009) (Assouline et al., 2011)

O diagnóstico definitivo é histológico com recurso a técnicas de imuno-histoquímica. (Becker, 2010) Após estabelecido, deverá proceder-se à realização de exames imagiológicos para definir a extensão exacta da doença. (Pectasides et al., 2006) (Becker, 2010)

De acordo com os protocolos mais recentes, deverá realizar-se primeiramente, uma ecografia abrangendo a provável área dos gânglios de drenagem do tumor, uma ecografia abdominal e uma radiografia torácica. De acordo com os resultados obtidos, poderão ser ponderados estudos imagiológicos mais detalhados. (Becker, 2010)

Uma vez que a disseminação linfática é frequente, é defendida a realização da biópsia do gânglio sentinela (BGS) que, de acordo com a literatura, apresenta micrometástases em cerca de 25% dos casos o que constitui um factor de mau prognóstico. (Pectasides et al., 2006) (Becker, 2010)

A suspeita da existência de metastização à distância impõe a realização de imagiologia adequada a cada caso. O padrão de disseminação à distância deste tumor não é específico, geralmente há uma invasão multifocal semelhante ao que ocorre em carcinomas de pequenas células. A localização preferencial das metástases compreende as áreas cutâneas distantes (9-30%), pulmão (10-23%), SNC (18%), ossos (10-15%) e por fim, fígado (13%). (Woo et al., 2010)



A realização de cintigrafia dos receptores de somatostatina, baseada nas características neuro-endócrinas deste tumor, pode ser usada para avaliação de disseminação à distância e recorrência loco-regional. No entanto, esta técnica apresenta limitações na capacidade de definir o grau de disseminação tumoral, especialmente na identificação de metástases a nível do fígado, baço e rins. (Pectasides et al., 2006) (Becker, 2010) Neste sentido, tem sido investigado o valor da PET com Ga 68-DOTATOC. (Pectasides et al., 2006)

Em relação aos sistemas de estadiamento, nos últimos 20 anos vários foram propostos. Em 1991, foi proposto um sistema com base em 70 casos de CM estudados no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Em 1999 e 2005 foram realizadas alterações no sistema original (Tabela II) e em 2010 foi concluído o sistema de estadiamento para o CM pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Tabelas III e IV). (Assouline et al., 2011)

Este último sistema de estadiamento, estruturado de modo semelhante aos sistemas de outras neoplasias cutâneas, é mais complicado de aplicar. Na literatura é usado frequentemente o sistema antigo. (Wong & Wang, 2010) (Assouline et al., 2011)

**Tabela II** - Sistema de estadiamento para CM 1995, 2005.

Adaptada de Assouline et al. (2011).

<i>Estádio</i>	<i>Descrição</i>
<b>I</b>	Doença limitada com diâmetro <2cm
<b>II</b>	Doença limitada com diâmetro ≥2cm
<b>III</b>	Envolvimento gânglios linfáticos regionais
<b>IV</b>	Doença metastática

**Tabela III** – Sistema de estadiamento TNM para CM.

Adaptada de Assouline et al. (2011).

<i>Tumor primário (T)</i>	
<b>Tx</b>	Não é possível avaliação do tumor primário
<b>T0</b>	Não existe evidência do tumor primário (e.g. apresentação linfática/metastática sem evidência da lesão primária)
<b>Tis</b>	Tumor primário <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor primário com dimensões máximas ≤ 2 cm
<b>T2</b>	Tumor primário com dimensões máximas > 2 cm mas ≤ 5 cm
<b>T3</b>	Tumor primário com dimensões máximas > 5 cm
<b>T4</b>	Tumor primário invade osso, músculo, fáscia ou cartilagem
<i>Gânglios linfáticos regionais (N)</i>	
<b>Nx</b>	Não é possível avaliação dos gânglios linfáticos regionais
<b>N0</b>	Sem envolvimento tumoral dos gânglios regionais
<b>cN0</b>	Gânglios linfáticos regionais negativos na avaliação clínica (ainda não realizado exame histopatológico)
<b>pN0</b>	Gânglios regionais negativos ao exame histopatológico
<b>N1</b>	Invasão tumoral dos gânglios regionais
<b>N1a</b>	Micrometástases
<b>N1b</b>	Macrometástases
<b>N2</b>	Metástases em trânsito
<i>Metástases à distância (M)</i>	
<b>M0</b>	Ausência de metástases à distância
<b>M1</b>	Existência de metástases para além dos gânglios linfáticos regionais
<b>M1a</b>	Metástases na pele, tecido subcutâneo ou gânglios linfáticos distantes
<b>M1b</b>	Metástases pulmonares
<b>M1c</b>	Metástases para outros órgãos

**Tabela IV** – Estágios anatômicos/Grupos prognóstico de acordo com sistema TNM.

Adaptada de Assouline et al. (2011).

<i>Estágio anatômico/Grupo prognóstico</i>			
<b>Estágio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estágio IA</b>	T1	pN0	M0
<b>Estágio IB</b>	T1	cN0	M0
<b>Estágio IIA</b>	T2/T3	pN0	M0
<b>Estágio IIB</b>	T2/T3	cN0	M0
<b>Estágio IIC</b>	T4	N0	M0
<b>Estágio IIIA</b>	Qualquer T	N1a	M0
<b>Estágio IIIB</b>	Qualquer T	N1b/N2	M0
<b>Estágio IV</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1

## Tratamento

O tratamento primário do CM passa pela excisão cirúrgica e verificação anátomo-patológica da completa remoção da lesão tumoral. Geralmente, a taxa de recorrência é elevada, justificando o recurso, em geral, à radioterapia adjuvante. A quimioterapia é usada essencialmente como tratamento paliativo, com taxas de resposta até 70%, mas com elevadas percentagens de recorrência nos meses seguintes. (Rockville MCC Group, 2009)

- Cirurgia

Quando possível, o tratamento cirúrgico é o adotado na abordagem terapêutica inicial. (Woo et al., 2010) (Assouline et al., 2011) As controvérsias neste campo estendem-se à margem de segurança necessária, o papel da BGS e ainda, à extensão da linfadenectomia. (Assouline et al., 2011)

Em relação à margem de segurança, tem sido recomendada a realização de excisão com margens alargadas, entre 2,5-3 cm. (Woo et al., 2010) (Becker, 2010) (Assouline et al., 2011) No entanto, alguns estudos apontam uma baixa taxa de recorrência (8%) com uma margem de 1 cm. (Woo et al., 2010)

A cirurgia micrográfica de Mohs mostrou resultados em termos de taxas de recorrência local semelhantes aos da cirurgia de margens alargadas. (Woo et al., 2010) (Assouline et al., 2011) No entanto, após execução da cirurgia de Mohs é aconselhável a realização de radioterapia adjuvante. Esta modalidade terapêutica é bastante adoptada em pequenas lesões tumorais localizadas na face devido aos bons resultados em termos de estética. (Assouline et al., 2011)

A necessidade e extensão da linfadenectomia é também uma grande área de debate. A excisão ganglionar completa é recomendada para a maioria dos pacientes com adenopatias palpáveis e com micrometástases nos gânglios linfáticos regionais. (Woo et al., 2010)

Num estudo realizado, verificou-se que tumores com diâmetro  $\leq 1$  cm apresentavam um elevado risco de metastização linfática e à distância (aproximadamente 40% dos pacientes com tumores de diâmetro  $\leq 1$  cm apresentavam BGS positiva) e portanto, a BGS é aconselhável em doentes que reúnam as condições adequadas. (Assouline et al., 2011) (Zager et al., 2011) A presença de células tumorais no estudo histológico indica a necessidade da realização de linfadenectomia completa. (Becker, 2010)

Factores como o diâmetro tumoral, a extensão em profundidade da lesão primária, a invasão linfovascular, a taxa mitótica e um padrão de crescimento infiltrativo estão associados a maior probabilidade de positividade da BGS. (Zager et al., 2011)

- Radioterapia

Em geral, as células de CM são radiosensíveis. (Woo et al., 2010) (Becker, 2010) (Assouline et al., 2011) A dose total considerada necessária para terapêutica é, segundo alguns autores, 50 Gy (dose única de 2 Gy, cinco vezes semanalmente) (Becker, 2010) enquanto outros apontam 60-66Gy / 30-33 fracções. (Assouline et al., 2011)

Actualmente existe debate em relação à realização de radioterapia adjuvante, opção defendida pela maioria dos autores. (Woo et al., 2010) (Becker, 2010) (Assouline et al., 2011) Em geral, a terapêutica de combinação - cirurgia e radioterapia adjuvante - está associada a um melhor controlo loco-regional e superiores taxas de sobrevivência. (Becker, 2010) (Assouline et al., 2011)

Análises retrospectivas indicam que a elevada taxa de recorrência observada após excisão do tumor primário (excisão cirúrgica com margem de 3 cm e linfadenectomia) pode

ser reduzida com realização de radioterapia loco-regional adjuvante. (Becker, 2010) Aliás, nos casos de recorrência o tempo médio decorrido desde a abordagem terapêutica inicial é superior no caso de realização de cirurgia e radioterapia adjuvante. (Assouline et al., 2011)

Num dos grandes estudos neste campo, verificou-se que pacientes submetidos a radioterapia adjuvante apresentavam sobrevivências médias de 63 meses, enquanto que pacientes não submetidos à mesma tinham sobrevivências médias de 45 meses. (Assouline et al., 2011)

Em suma, a combinação da excisão cirúrgica alargada, linfadenectomia profilática e radioterapia adjuvante tem reduções significativas das taxas de recorrência loco-regional e à distância e superior taxa de sobrevivência. (Wong & Wang 2010) (Assouline et al., 2011)

Assim, recomenda-se realização de radioterapia em lesões com diâmetro superior a 1,5 cm, invasão vascular e/ou perineural, margens microscopicamente positivas, presença de doença residual e/ou envolvimento de gânglios linfáticos. É ainda recomendada em pacientes nos quais não se tenha procedido à BGS. (Woo et al., 2010)

Aliás, mesmo para lesões à distância, e nestes casos com intuito essencialmente paliativo, a radioterapia pode ser realizada num contexto de terapêutica multimodal combinada com excisão cirúrgica e/ou quimioterapia sistémica. (Becker, 2010)

- Terapêutica sistémica

Apesar do CM parecer ser quimiossensível (Woo et al., 2010) (Wong & Wang, 2010), é questionável o papel da quimioterapia como tratamento adjuvante pois, embora possam ser alcançadas taxas de remissão de 70%, verificam-se elevadas toxicidade e taxas de resposta de curta duração, com aumentos da sobrevivência não significativos quando incluída no esquema terapêutico. (Woo et al., 2010) (Assouline et al., 2011) Contudo, num subgrupo de pacientes

com características de alto risco, invasão de gânglios linfáticos e excelente condição geral, poderá ponderar-se como tratamento adjuvante. (Assouline et al., 2011)

Os esquemas de quimioterapia usados incluem, entre outros fármacos, antraciclinas, antimetabolitos, bleomicina, ciclofosfamida, etoposido e derivados da platina, usados isoladamente ou combinados. (Becker, 2010)

Em geral, a quimioterapia está indicada como medida paliativa quando existe doença disseminada, contudo dados os riscos de toxicidade e o facto de doentes com CM pertencerem geralmente a faixas etárias mais avançadas, a sua administração deverá ser ponderada caso a caso. (Becker, 2010)

- Novas terapêuticas

A recente descoberta da relação entre o vírus MCPyV e o desenvolvimento do CM abriu novas possibilidades no âmbito terapêutico, nomeadamente o uso de interferão com efeito antiviral ou o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas dirigidas para proteínas produzidas e induzidas pelo vírus. Até à data apenas alguns casos são reportados do uso destes agentes. (Becker, 2010) (Assouline et al., 2011)

Novos estudos terão ainda de ser realizados neste campo, com realce para a introdução de um esquema de profilaxia com vacinação contra o MCPyV. (Assouline et al., 2011)

## **Vigilância. Prognóstico**

A recorrência local e/ou aparecimento de metástases geralmente ocorrem nos primeiros dois anos desde o diagnóstico inicial. Assim, o seguimento dos pacientes deverá nos dois primeiros anos ser efectuado a cada 1-3 meses no 1º ano e a cada 3-6 meses no 2º ano, passando posteriormente a ser anual. (Becker, 2010) (Assouline et al., 2011)

Em cada consulta de vigilância efectuar-se-á o exame físico completo, com requisição de exames complementares se indicado. (Assouline et al., 2011)

Em termos de prognóstico, estamos perante um tumor agressivo, com uma tendência apreciável para a metastização precoce ganglionar e à distância. As taxas de sobrevivência aos dois anos após o diagnóstico rondam os 76% (Zager et al., 2011), com uma taxa de mortalidade de 33% em três anos desde o diagnóstico (Wong & Wang, 2010).

As taxas de sobrevivência aos cinco anos desde o diagnóstico oscilam entre os 75% no caso de pacientes com lesão primária sem atingimento linfático ou doença disseminada, 59% no caso de invasão linfática (e/ou recorrências locais) e 25% na presença de doença à distância. (Becker, 2010)

Os factores clínicos e patológicos condicionantes do prognóstico, também contemplados no sistema de estadiamento, incluem o diâmetro da lesão primária, a suspeita clínica e confirmada por estudo imuno-histoquímico de invasão dos gânglios linfáticos regionais e a presença ou não de metástases. (Zager et al., 2011)

Apesar dos resultados serem contraditórios entre os estudos, múltiplos factores, preditores de um mau prognóstico, são apontados na literatura: sexo masculino, localização da lesão primária à face/região cervical ou tronco e a presença de imunossupressão. (Kaae et al., 2010) (Becker, 2010)



Vários autores analisaram a relação entre características histológicas tumorais e a sua relevância no prognóstico. Andea et al. (2008) verificaram que um padrão de crescimento nodular vs infiltrativo, localização superficial (derme/subcutânea vs tecidos mais profundos), ausência de invasão linfovascular e presença de infiltrado linfocítico na massa tumoral correlacionavam-se directamente com a sobrevivência ao contrário da espessura da lesão primária, presença de necrose ou ulceração.

Kaae et al. (2010), como outros autores, realçam a importância de um diagnóstico precoce e o impacto significativo do mesmo em termos de prognóstico.

## Conclusão

A realização da presente revisão permitiu esclarecer o papel da infecção pelo recentemente identificado poliomavírus humano MCPyV na oncogênese do CM, bem como avaliar o impacto da radiação UV no mesmo.

Na maioria dos estudos a prevalência de MCPyV em lesões de CM ronda os 70-80%, embora os resultados variem de acordo com a área geográfica considerada. (Kuwamoto, 2011)

Em grande percentagem de células tumorais verifica-se a presença de material genómico viral integrado no DNA hospedeiro e a expressão de um elevado número de cópias virais, incluindo a oncoproteína antigénio T grande. A resposta serológica significativa e específica para o vírus MCPyV em pacientes com CM suporta também esta relação. (Carter et al., 2009) (Paulson et al., 2010)

Ao nível molecular verificam-se alterações decorrentes da infecção viral: o processo de integração clonal do vírus e a codificação de oncoproteínas como os antigénios T que interferem no funcionamento de proteínas supressoras tumorais e envolvidas nos processos de regulação do ciclo celular. (Johnson, 2010) (Feng et al., 2011) (Kuwamoto, 2011) (Bhatia et al., 2011) Já ao nível histológico verificam-se diferenças morfológicas e imuno-histoquímicas entre células tumorais positivas e negativas para a presença do vírus enquanto que no âmbito da clínica/prognóstico os resultados obtidos são controversos. (DeCaprio, 2009) (Katano et al., 2009)

Quanto ao papel da radiação UV, verifica-se, para além do atingimento preferencial de áreas foto-expostas e os casos de pacientes com CM metácrono e/ou síncrono com outras neoplasias cutâneas associadas à radiação UV (Heath et al., 2008) (Houben et al., 2009), a existência de mutações em células de CM sugestivas da acção mutagénica da radiação UV-B

e, em menor grau, UV-A. (Popp et al., 2002) (Calzavara-Pinton et al, 2010) Além disto, evidências suportam que a exposição prolongada à radiação UV-A pode aumentar o risco de CM. (Calzavara-Pinton et al, 2010)

Alguns autores estabelecem mesmo uma relação da acção mutagénica da radiação UV sobre o genoma do MCPyV. (Nakamura et al., 2010) (Mogha et al., 2010)

Por último, de referir que apesar da relação estabelecida entre a infecção pelo MCPyV e o processo de oncogénese do CM, vários pontos continuam a ser alvo de controvérsia e motivo de pesquisa na área, nomeadamente a existência de outros factores etiológicos na base da transformação maligna conducente a esta lesão.

Por outro lado, a descoberta deste vírus e, consequentemente, o realce dado ao sistema imune, na patogénese do CM poderá abrir novas perspectivas terapêuticas/novos alvos terapêuticos capazes de introduzir uma melhoria no prognóstico desta neoplasia com um comportamento biológico agressivo.

## Referências Bibliográficas

1. Andea CC, Coit DG et al. (2008) Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis. *Cancer* 113(9): 2549-2558;
2. Andrabi S, Gjoerup OV et al. (2007) Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *PNAS* 104(48): 19011-19016;
3. Andres C, Belloni B et al. (2011) Immunohistochemical Features of Merkel Cell Carcinoma in Correlation with Presence of Merkel Cell Polyomavirus DNA. *Acta Derm Venereol* 91(6);
4. Assouline A, Tai P et al. (2011) Merkel cell carcinoma of skin – current controversies and recommendations. *Rare Tumours* 3(2): e23;
5. Becker JC (2010) Merkel cell carcinoma. *Annals of Oncology* 21(7): 81-85;
6. Becker JC, Houben R et al. (2009) MC Polyomavirus is Frequently Present in Merkel Cell Carcinoma of European Patients. *Journal of Investigative Dermatology* 129(1): 248-250;
7. Bhatia K, Goedert JJ et al. (2010) Immunological detection of viral large T antigen identifies a subset of Merkel cell carcinoma tumors with higher viral abundance and better clinical outcome. *Int J Cancer* 127(6): 1493-1496;
8. Bhatia K, Goedert JJ et al. (2010) Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer* 126(9): 2240-2246;
9. Bhatia S, Afanasiev O et al. (2011) Immunobiology of Merkel Cell Carcinoma: Implications for Immunotherapy of a Polyomavirus-Associated Cancer. *Curr Oncol Rep* 13(6): 488-497;

10. Brunner M, Thurner D et al. (2008) Expression of VEGF-A/C, VEGF-R2, PDGF- $\alpha/\beta$ , c-kit, EGFR, Her-2/Neu, Mcl-1 and Bmi-1 in Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology* 21 (7): 876-884;
11. Calvazara-Pinton P, Monari P et al. (2010) Merkel cell carcinoma arising in immunosuppressed patients treated with high-dose UV A<sub>1</sub> phototherapy. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 26(5): 263-265;
12. Carter JJ, Paulson KG et al. (2009) Association of Merkel Cell Polyomavirus – Specific Antibodies with Merkel Cell Carcinoma. *J Natl Cancer* 101(21): 1510-1522;
13. DeCaprio JA (2009) Does Detection of Merkel Cell Polyomavirus in Merkel Cell Carcinoma Provides Prognostic Information?. *JNCI* 101(13): 905-906;
14. Duncavage EJ, Zehnbaauer BA et al. (2009) Prevalence of Merkel Cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology* 22: 516-521;
15. Feng H, Kwun HJ et al. (2011) Cellular and Viral Factors Regulating Merkel Cell Polyomavirus Replication. *PLoS ONE* 6(7): e22468;
16. Feng H, Shuda M et al. (2008) Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* 319(5866): 1096-1100;
17. Fernández-Figueras MT, Puig L et al. (2007) Expression profiles associated with aggressive behavior in Merkel cell carcinoma. *Modern Pathol* 20(1): 90-101;
18. Fischer N, Brandner J et al. (2010) Detection of MCPyV in Merkel cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 126(9): 2133-2142;
19. Garneski KM, Warcola AH et al. (2009) Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol* 129(1): 246-248;
20. Gele MV, Kaghad M et al. (2000) Mutation analysis of P73 and TP 53 in Merkel cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 82(4): 823-826;

21. Handschel J, Müller D et al. (2010) The new polyomavirus does not affect the clinical course in MCCs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 39(11): 1086-1090;
22. Harrison CJ, Meinke G et al. (2011) Asymmetric Assembly of Merkel Cell Polyomavirus Large T-Antigen Origin Binding Domains at the Viral Origin. *J Mol Biol* 409(4): 529-542;
23. Hausen H (2008) Novel human polyomaviruses – Re-emergence of a well Known virus family as possible human carcinogens. *Int J Cancer* 123(2): 247-250;
24. Heath M, Jaimes N et al. (2008) Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the “AEIOU” features. *J Am Acad Dermatol* 58(3): 375-381;
25. Helmbold P, Lahtz C et al. (2009) Frequent Occurrence of RASSF1A Promoter Hypermethylation and Merkel Cell Polyomavirus in Merkel Cell Carcinoma. *Molecular Carcinogenesis* 48(10): 903-909;
26. Houben R, Adam C et al. (2011) An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 130(4): 847 – 856;
27. Houben R, Michel B et al. (2006) Absence of Classical MAP Kinase Pathway Signalling in Merkel Cell Carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* 126(5): 1135-1142;
28. Houben R, Schrama D et al. (2009) Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma. *Experimental Dermatology* 18(3): 193-198;
29. Houben R, Schrama D et al. (2010) Comparable expression and phosphorylation of the Retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus positive and negative Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 126(3): 796-798;

30. Houben R, Shuda M et al. (2010) Merkel Cell Polyomavirus-Infected Merkel Cell Carcinoma Cells require expression of Viral T Antigens. *Journal of Virology* 84(14): 7064-7072;
31. Johnson EM (2010) Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends in Microbiology* 18(5): 215-221;
32. Kaae J, Hansen AV et al. (2010) Merkel Cell Carcinoma: Incidence, Mortality and Risk of Other Cancers. *J Natl Cancer Inst* 102(11): 793-801;
33. Kartha RV, Sundram UM (2008) Silent mutations in KIT and PDGFRA and coexpression of receptors with SCF and PDGFA in Merkel cell carcinoma: implications for tyrosine kinase-based tumorigenesis. *Modern Pathol* 21(2): 96-104;
34. Katano H, Ito H et al. (2009) Detection of Merkel Cell Polyomavirus in Merkel Cell Carcinoma and Kaposi's Sarcoma. *J of Medical Virology* 81(11): 1951-1958;
35. Khalili K, White MK et al. (2005) The Agnoprotein of Polyomaviruses: A Multifunctional Auxiliary Protein. *J of Cellular Physiology* 204(1):1-7;
36. Koljonen V, Kukko H et al. (2010) Second cancers following the diagnosis of Merkel cell carcinoma. *Cancer Epidemiology* 34(1): 62-65;
37. Kumar V, Abbas AK, Fausto N (2005) *Patologia – Bases Patológicas das Doenças*. In: *Neoplasia (7<sup>a</sup> ed)*, pp 302-322. Rio de Janeiro: Elsevier Editora.
38. Kuwamoto S (2011) Recent advances in the biology of Merkel cell carcinoma. *Human Pathology* 42(8): 1063-1077;
39. Kuwamoto S, Higaki H et al. (2011) Association of Merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in Merkel cell carcinoma. *Human Pathology* 42(5): 632-640;
40. Kwun HJ, Guastafierro A et al. (2009) The Minimum Replication Origin of Merkel Cell Polyomavirus Has a Unique Large T-Antigen Loading Architecture and Requires

Small T-Antigen Expression for Optimal Replication. *Journal of Virology* 83(23): 12118-12128;

41. Lassacher A, Heitzer, E et al. (2008) p14ARF Hypermethylation is Common but INK4a-ARF Locus or p53 Mutations Are Rare in Merkel Cell Carcinoma. *Journal of Investigative Dermatology* 128(7): 1788-1796;
42. Laude HC, Jonchère B et al. (2010) Distinct Merkel Cell Polyomavirus Molecular Features in Tumour and Non Tumour Specimens from Patients with Merkel Cell Carcinoma. *PLoS Pathog* 6(8): e1001076;
43. Loyo M, Preston RG et al. (2010) Quantitative detection of Merkel Cell Virus in human tissues and possible mode of transmission. *Int J Cancer* 126(12): 2991-2996;
44. Mogha A, Fautrel A et al. (2010) Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen mRNA Level Is Increased following In Vivo UV Radiation. *PLoS ONE* 5(7): e11423;
45. Nakamura T, Sato Y et al. (2010) Nuclear localization of Merkel Cell polyomavirus large T antigen in Merkel cell carcinoma. *Virology* 398(2): 273-279;
46. Paulson KG, Carter JJ et al. (2010) Antibodies to Merkel Cell Polyomavirus T Antigen Patients Oncoproteins Reflect Tumor Burden in Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res* 70(21): 8388-8397;
47. Paulson KG, Lemos BD et al. (2009) Array-CGH Reveals Recurrent Genomic Changes in Merkel Cell Carcinoma Including Amplification of L-Myc. *J of Investigative Dermatology* 129(6): 1547-1555;
48. Pectasides D, Pectasides M et al. (2006) Merkel cell cancer of the skin. *Annals of Oncology* 17(10): 1489-1495;
49. Popp S, Waltering S et al. (2002) UV-B – Type Mutations and Chromosomal imbalances indicate common pathways for the development of Merkel and skin Squamous Cell Carcinomas. *Int J Cancer* 99(3): 352-360;



- 50.** Pulitzer MP, Amin BD et al. (2009) Merkel Cell Carcinoma. *Adv Anat Pathol* 16(3): 135-144;
- 51.** Sastre-Garau X, Peter M et al. (2009) Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol* 218(1): 48-56;
- 52.** Schlagbauer-Wadl H, Klosner G et al. (2000) Bcl-2 Antisense Oligonucleotides (G3139) Inhibit Merkel Cell Carcinoma in SCID Mice. *J Invest Dermatol* 114(4): 725-730;
- 53.** Schowalter RM, Pastrana DV et al. (2010) Merkel Cell Polyomavirus and Two Novel Polyomaviruses are chronically shed from Human Skin. *Cell Host Microbe* 7(6): 509-515;
- 54.** Schowalter RM, Pastrana DV et al. (2011) Glycosaminoglycans and Sialylated Glycans Sequentially Facilitate Merkel Cell Polyomavirus Infectious Entry. *PLoS Pathog* 7(7): e1002161;
- 55.** Shuda M, Arora R et al. (2009) Human Merkel cell polyomavirus infection I. *Int J Cancer* 125(6): 1243-1249;
- 56.** Sihto H, Kukko H et al. (2009) Clinical Factors Associated with Merkel Cell Polyomavirus Infection in Merkel Cell Carcinoma. *J Natl Cancer* 101(13): 938-945;
- 57.** Sihto H, Kukko H et al. (2011) Merkel Cell Polyomavirus Infection, Large T Antigen, Retinoblastoma Protein and Outcome in Merkel Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 17(14): 4806-4813;
- 58.** The Rockville Merkel Cell Carcinoma Group (2009) Merkel Cell Carcinoma: Recent Progress and Current Priorities on Etiology, Pathogenesis, and Clinical Management. *J Clin Oncol* 27(4): 4021-4026;

- 59.** Toracchio S, Foyle A et al. (2010) Lymphtropism of Merkel Cell Polyomavirus Infection, Nova Scotia, Canada. *Emerging Infectious Diseases* 16(11): 1702-1708;
- 60.** Vilar-Coromina N, Bueno FP et al. (2009) Carcinoma de células de Merkel cutáneo: incidencia y supervivencia poblacional, 1995-2005. *Med Clin* 132(18): 701-703;
- 61.** Wong H, Wang J (2010) Merkel Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 134(11): 1711-1716;
- 62.** Woo KJ, Choi YL et al. (2010) Merkel cell carcinoma: Our experience with seven patients in Korea and a literature review. *J of Plastic, Reconstructivw & Aesthetic Surgery* 63(12): 2064-2070;
- 63.** Zager JS, Rollison DE et al. (2011) Prognostication in Merkel cell carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther* 11(5): 665-667.