

*JANAÍNA LUISA LEITE*

**ESTUDO DOS HERPESVÍRUS HUMANOS TIPO 6 E TIPO 1  
E SUA INTER-RELAÇÃO COM O GENE *TP53* EM  
DIFERENTES CONDIÇÕES PATOLÓGICAS**

*CAMPINAS*

*2007*

*JANAÍNA LUISA LEITE*

**ESTUDO DOS HERPESVÍRUS HUMANOS TIPO 6 E TIPO 1  
E SUA INTER-RELAÇÃO COM O GENE *TP53* EM  
DIFERENTES CONDIÇÕES PATOLÓGICAS**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade  
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para  
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.*

***ORIENTADORA: PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> LAURA STERIAN WARD***

***CAMPINAS***

***2007***

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L536e Leite, Janaína Luisa  
Estudos dos Herpesvírus Humanos tipo 6 e tipo 1 e sua inter-relação com o gene TP53 em diferentes condições patológicas / Janaína Luisa Leite . Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientador : Laura Sterian Ward  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Herpesvirus. 2. Doença de Graves. 3. Imunossupressão.  
4. Pele – Câncer. 5. Genes, p53. I. Ward, Laura Sterian. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

**Título em inglês : “Study of herpes viruses types 6 and type 1 and their relationship with TP53 gene in distinct pathological conditions”**

**Keywords:** • Herpesviruses  
• Graves’s Disease  
• Immunossupression  
• Skin – neoplasms  
• Genes, p53

**Titulação: Doutor em Farmacologia**

**Banca examinadora: Profa. Dra. Laura Sterian Ward  
Prof Dr David Salomão Lewi  
Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima  
Profa. Dra. Irandaia Ubirajara Garcia  
Prof Dr José Barreto Campello Carvalheira**

**Data da defesa: 31 - 07 - 2007**

---

## Banca Examinadora da Tese de Doutorado

---

---

**Orientador:**

**Profa. Dra. Laura Sterian Ward**

---

---

**Membros:**

---

**Profa. Dra. Laura Sterian Ward**

**Profa. Dr. David Salomão Lewi**

**Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**

**Profa. Dra. Irandaia Ubirajara Garcia**

**Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira**

---

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Estadual de Campinas.**

---

**Data: 30/07/2007**

---

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus pais, Adilson e Dariana, pelo esforço que fizeram para poder me proporcionar um estudo de qualidade, acreditando no meu sonho e fazendo-o se tornar realidade, pelo apoio e incentivo, sempre.*

*Ao meu irmão, André, pela amizade e pelo apoio, sempre se orgulhando da sua irmãzinha.*

*E ao meu marido Douglas, pelo amor e carinho em todos os momentos, desde quando nos conhecemos. Pela amizade e dedicação por um ideal que agora compartilhamos por toda a nossa vida, por um sonho que agora é nosso!*

Primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado, me guiando pelo caminho que devo seguir, muitas vezes por aquele que parece ser o mais difícil, mas, com certeza, é o que aprendemos mais.

Aos meus pais, Adilson e Dariana, que me deram a oportunidade de ter um estudo de qualidade, me apoiando na minha carreira e nas minhas conquistas, e acima de tudo, de estar aqui hoje podendo dizer que venci mais essa etapa da vida, junto a vocês. Obrigada!

Ao meu marido Douglas, que é a minha luz e o meu guia, em quem eu me apoio muitas vezes, nos momentos de cansaço e tristeza, me confortando com simples palavras, mas que são aquelas que precisávamos ouvir naquele momento! Te amo muito!

Ao meu querido irmão André, que me acompanha há 28 anos, estando presente em todos os momentos bons e ruins da minha vida, fazendo a maior torcida pelo meu sucesso e a recíproca é verdadeira!

A toda a minha família que, em todos os momentos também fazem torcida por mim, que estão presentes sempre que possível e olha que a família é grande: os Pereira Leite, os Assunção, os Pansani, os Garbim e os Damico.

Às minha amigas do laboratório GEMOCA pela amizade, à Elaine pelo exemplo de perseverança, à Kika pela determinação, à Natássia pela dedicação, companheiras de sucesso, que sempre me deram apoio nos projetos de pesquisa, nas dificuldades da pesquisa, nas viagens de congressos (uhuuu!!!), nas discussões no café da tarde, enfim, no companheirismo que temos e conquistamos nestes 8 anos de ótima convivência!

À Aline, super-companheira que está se tornando uma ótima pesquisadora, à Joyce, Flávia, Priscila, Carol (minha priminha linda que também está conquistando seu espaço nesta carreira de pesquisadora), Marjory, Marielly, Juliana, Tiago, Luiz, Renato, que fazem parte da nossa equipe e que nos dão um apoio imprescindível, além dos bons momentos de risada no laboratório.

Às amigas e vizinhas do laboratório, Viviane, Juliana e Helen, que dividem conosco as alegrias e tristezas do nosso dia-a-dia.

Às amigas Joseane e Carina “pikitinha”, pelos vários momentos juntas e almoços de muita risada e discussão.

Às amigas Sandra Bonon, do laboratório de HCMV, Juliana, Patrícia, Soemes e Felipe, do laboratório da Nefrologia, pela ajuda em muitos momentos e pela amizade.

À Dra. Laura, que acreditou no meu potencial desde o começo, quando eu ainda era uma menina, aluna do 1º ano de Ciências Biológicas da Puc-Campinas, apostando que um dia eu iria me tornar uma pesquisadora. Obrigada!

À Fapesp, que me deu a oportunidade e apoio financeiro para desenvolver este trabalho.

Aos pacientes envolvidos neste trabalho, que aceitaram participar e contribuir para esta pesquisa, doando um pouco do seu tempo e da sua paciência em responder nossos questionários, mesmo nos momentos de sofrimento, muito obrigada!!

Ao Wanderlei, do Departamento de Farmacologia, pela atenção e auxílio, sempre.

Obrigada a todos vocês!

## ***PREFÁCIO***

*“A vida não nos exige sacrifícios inatingíveis; ela nos pede que façamos nosso caminho com alegria no coração e que sejamos uma bênção para os que nos rodeiam, de forma que, se deixarmos o mundo apenas um pouquinho melhor do que era antes da nossa visita, teremos cumprido a nossa missão.”*

**Dr. Edward Bach**

	<i><b>PÁG.</b></i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xxix</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xxxiii</i>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>Parte I- Herpesvírus e o câncer de pele – Câncer</b> .....	39
Câncer de pele.....	39
Vírus.....	43
Herpesvírus.....	43
HHV-6 - Prevalência e estrutura.....	45
Mecanismos de infecção.....	47
Detecção dos herpesvírus.....	51
Reativação viral.....	52
HHV-1.....	53
<b>Parte II- Câncer de pele e os genes do sistema Glutathiona S-transferase-GSTs</b> .....	57
<b>Parte III- Indivíduos imunossuprimidos e sua relação com o gene <i>TP53</i> e com os herpesvírus</b> .....	59
Códon 72.....	61
Códon 47.....	62
<b>Parte IV- Herpesvírus na doença de Basedow-Graves e sua relação com a habilidade apoptótica de <i>TP53</i></b> .....	63

<b>OBJETIVOS.....</b>	65
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	69
Identificação do HHV-6 e HHV-1 em câncer de pele.....	71
Estudo dos polimorfismos do sistema Glutathiona S-transferase.....	76
Estudo dos polimorfismos do éxon 4 de <i>TP53</i> em pacientes transplantados renais.....	79
Estudo dos polimorfismos do códon 72 do gene <i>TP53</i> em pacientes com doença de Basedow-Graves.....	84
Análises estatísticas.....	84
<b>RESULTADOS.....</b>	85
<b>Parte I- Herpesvírus e o câncer de pele.....</b>	87
<b>Parte II- Câncer de pele e o sistema Glutathiona S-transferase.....</b>	90
<b>Parte III- Imunossuprimidos, o gene <i>TP53</i> e os herpesvírus.....</b>	92
<b>Parte IV- Herpesvírus, doença de Basedow-Graves e gene <i>TP53</i>.....</b>	95
<b>DISCUSSÃO.....</b>	97
Herpesvírus e o câncer de pele.....	99
Câncer de pele e o sistema Glutathiona S-transferase.....	103
Imunossuprimidos, o gene <i>TP53</i> e os herpesvírus.....	105
Herpesvírus, doença de Basedow-Graves e gene <i>TP53</i> .....	107
<b>CONCLUSÃO.....</b>	109
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	113
<b>ANEXOS.....</b>	143

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ARG	arginina
B	brancos
BCC	carcinomas de células basais
bp	pares de bases
CFS	Síndrome da fadiga crônica
IC	índice de confiança
CMV ou HCMV	Citomegalovírus humano
CNS	Sistema nervoso central
CTLA4	antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos
DG	doença de Basedow-Graves
DR	repetições diretas
EBV	Vírus Epstein-Barr
ELISA	ensaios de imunoadsorção ligado à enzima
F	teste exato de Fisher
FCM-UNICAMP	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
GST	Sistema Glutathione S-transferase
<i>GSTM1</i>	Glutathione S-transferase <i>mul</i>
<i>GSTO2</i>	Glutathione S-transferase <i>ômega2</i>
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase <i>pi1</i>
<i>GSTT1</i>	Glutathione S-transferase <i>teta1</i>
HC	Hospital de Clínicas da Unicamp
HET	heterozigoto
HHV	herpesvírus humano
HHV-1 ou HSV-1	Herpesvírus humano tipo 1 ou Human simplex virus 1
HHV-3	Herpesvírus humano tipo 3
HHV-4	Herpesvírus humano tipo 4
HHV-5	Herpesvírus humano tipo 5
HHV-6	Herpesvírus humano tipo 6

HHV-7	Herpesvírus humano tipo 7
HHV-8	Herpesvírus humano tipo 8
HLA	antígeno leucocitário humano
HO	homozigoto
HSV-2 ou HHV-2	Human simplex virus 2 ou Herpesvírus humano tipo 2
HT	Tireoidite de Hashimoto
HTLV-1	vírus humano de células T linfotrópico
IBA	ensaios de imunoblot
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM-1	moléculas de adesão intra celular tipo 1
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus
IE	immediate-early
IFA	ensaios de imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
kb	kilobases
KSHV	vírus do Sarcoma de Kaposi
KW	Teste de Kruskal-Wallis
MM	melanomas malignos
MS	Esclerose múltipla
NB	não-brancos
NTA	testes de neutralização
OR	teste de Odds Ration ou razão das chances
ORFs	open reading frames
p38 MAPK	p38 proteína kinase mitógena ativada
p53	proteína do gene <i>TP53</i>
PBMCs	células mononucleares do sangue periférico
PCR	reação de polimerase em cadeia
PRO	prolina
RFLP	restrição do polimorfismo pelo tamanho do fragmento
S47	serina 47

SAS	Sistema de análise estatística
SCC	carcinomas de células escamosas
SD	desvio padrão
SER	serina
T <sub>3</sub>	triiodotironina
T <sub>4</sub> livre	tiroxina
Taq	enzima <i>Termus aquaticus</i>
TCR	receptor de linfócitos T-helper
Trab	anticorpo antitireoidiano
TSH	hormônio estimulante da tireóide
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo-Botucatu
UVR	raios ultra-violeta
VZV	Vírus Varicela Zoster
WT	selvagem
X	média
X <sup>2</sup>	Chi-quadrado

	<b>PÁG.</b>
<b>Tabela 1-</b> Classificação dos herpesvírus de acordo com o CITV.....	44
<b>Tabela 2-</b> Casuística dos pacientes, grupo controle e imunossuprimidos para o estudo dos herpesvírus e câncer de pele.....	72
<b>Tabela 3-</b> Primers para HHV-6, HHV-1 e <i>beta-globina</i> .....	74
<b>Tabela 4-</b> Primers para Glutathione S-transferases.....	78
<b>Tabela 5-</b> Primers para P72 e S47.....	83
<b>Tabela 6-</b> Herpesvírus e câncer de pele. Características clínicas dos pacientes e do grupo controle.....	87
<b>Tabela 7-</b> Estudo das Glutathione S-transferases. Distribuição dos indivíduos controles e dos pacientes.....	91
<b>Tabela 8-</b> Distribuição das combinações dos genótipos <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nos pacientes e controles.....	92
<b>Tabela 9-</b> Distribuição dos genótipos dos códons 72 e 47 de <i>TP53</i> para pacientes e grupo controle.....	94
<b>Tabela 10-</b> Risco relativo estimado para a infecção por HHV-6 e HHV-1 associadas aos genótipos do éxon 4 de <i>TP53</i> .....	95
<b>Tabela 11-</b> Estudo do HHV-6 e <i>TP53</i> em portadores da Doença de Basedow-Graves. Distribuição dos genótipos do códon 72 de <i>TP53</i> nos pacientes e grupo controle.....	96

		<b>PÁG.</b>
<b>Figura 1-</b>	Estimativa de 2006 para o câncer de pele não-melanoma no Brasil para os homens.....	41
<b>Figura 2-</b>	Estimativa de 2006 para o câncer de pele não-melanoma no Brasil para as mulheres.....	42
<b>Figura 3-</b>	Herpesvírus e suas estruturas.....	46
<b>Figura 4-</b>	Alinhamento das seqüências de HCMV, HHV-6 e HHV-7.....	49
<b>Figura 5-</b>	Ciclo de vida do HSV.....	55
<b>Figura 6-</b>	Organização do genoma do HHV-1.....	56
<b>Figura 7-</b>	Localização do gene <i>TP53</i> .....	61
<b>Figura 8-</b>	Gel de agarose para a detecção dos fragmentos de HHV-6 e HHV-1.....	75
<b>Figura 9-</b>	Gel de agarose para a detecção dos fragmentos da PCR multiplex para os genes <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>beta-globina</i> .....	77
<b>Figura 10-</b>	Gel de agarose para a detecção dos fragmentos da PCR para <i>GSTP1</i> .....	78
<b>Figura 11-</b>	Gel de agarose para a detecção dos fragmentos da PCR para <i>GSTO2</i> .....	79
<b>Figura 12-</b>	Reação de nested PCR para HHV-6.....	80
<b>Figura 13-</b>	Gel de agarose para a detecção dos fragmentos de PCR para prolina.....	81
<b>Figura 14-</b>	Gel de agarose para a detecção dos fragmentos de PCR para arginina.....	82
<b>Figura 15-</b>	Gel de agarose para a detecção dos fragmentos de RFLP para o polimorfismo do códon 47 de <i>TP53</i> .....	84
<b>Figura 16 -</b>	Gráfico da prevalência de HHV-1 e HHV-6 em lesões de pele.....	88

***RESUMO***

Interações entre vírus, o sistema imunológico e a ação de enzimas detoxificantes têm sido associadas à etiologia de muitas doenças incluindo o câncer e várias doenças auto-imunes. Investigamos o papel dos herpes vírus tipo 6 (HHV-6) e tipo 1 (HHV-1) e das variantes do códon 72 (P72) e códon 47 do éxon 4 de *TP53*, responsáveis por uma diminuição da atividade antiapoptótica de *TP53*, na suscetibilidade ao câncer de pele e à Doença de Basedow-Graves. Utilizamos PCR para a detecção dos vírus, polimorfismos de *TP53* e GSTs, com restrição enzimática para alguns dos polimorfismos.

Quando estudamos 120 pacientes com lesões de pele, comparados com 41 controles mostramos que a infecção por HHV-6 aumenta o risco de um indivíduo apresentar carcinoma basocelular (OR=3,182;95%IC:1,125-8,997). O risco para indivíduos infectados por HHV-1 foi aumentado em seis vezes (OR=6,078;95%IC:1,365-27,061). Observamos que este risco tendia a ser maior entre os indivíduos imunosuprimidos. Estudamos 78 pacientes transplantados renais comparados com 151 controles. A infecção por HHV-6 foi realmente mais freqüente nos transplantados renais (35,89%) do que nos controles (11,25%) (F;  $p < 0,0001$ ). Indivíduos positivos para HHV-6 apareciam com maior freqüência entre os transplantados renais que possuíam variantes de P72 (60,71%) do que nos que apresentaram o genótipo selvagem Arg/Arg (22%) (F;  $p = 0,001$ ). Para estudarmos a relação entre o HHV-6 e as doenças auto-imunes, analisamos 127 pacientes com diagnóstico da Doença de Basedow-Graves, observando que indivíduos que estavam infectados pelo HHV-6 tinham maior risco de desenvolver esta doença (OR=2,225;95%IC=1,197-4,135). O genótipo Pro/Pro de *TP53* estava presente em 11,8% dos pacientes com Doença de Basedow-Graves ( $p < 0,001$ ), aumentando significativamente o risco para a doença (OR=28,395; 95%IC=1,658-486,36).

Assim, nossos estudos mostram que a presença do HHV-6 e HHV-1 aumenta o risco para o câncer de pele, sugerindo que esses vírus podem ter um papel na suscetibilidade a malignidades da pele; a herança germinativa de P72 aumenta o risco para a infecção de HHV-6 e há uma tendência para o aumento de risco para desenvolvimento da Doença de Basedow-Graves quando associamos a infecção por HHV-6 e a presença do alelo prolina do códon 72 de *TP53*.

***ABSTRACT***

Interactions between viruses, the immune system and detoxifying enzymes have been associated to the etiology of many conditions including cancer and various autoimmune diseases. We investigated the role of herpes viruses type 6 (HHV-6) and 1 (HHV-1) and the codon 72 (P72) and codon 47 (S47) variants of exon 4 of *TP53*, responsible for a diminished antiapoptotic activity of *TP53*, in the susceptibility to skin cancer and to Graves-Basedow Disease. We used PCR for virus detection, *TP53* polymorphisms and GSTs, with restriction fragment length polymorphism analysis of some polymorphisms.

When we studied 120 patient with skin lesions, compared with 41 controls we showed that the HHV-6 infection increases the risk of a patient to present basal cell carcinoma (OR=3.182; 95%CI: 1.125-8.997). The risk for HHV-1 infected patients was increased six times (OR=6.078;95%CI:1.365-27.061). We observed that this risk tended to be higher among immunocompromized patients. Were studied 78 kidney recipients compared with 151 controls. Was observed that HHV-6 infection was more frequent among kidney recipient patients (35.89%) than among the controls (11.25%) (F;p<0.0001). We also observed that HHV-6 positive patients appeared more frequently among kidney recipients patients that presented P72 variants (60.71%) than among those presenting the wild-type genotype Arg/Arg (22%) (F; p=0.001). To study the relationship between HHV-6 and autoimmune diseases, we analyzed 127 patients with Graves-Basedow Disease, observing that HHV-6 infected patients had a higher risk to developed this disease (OR=2.225;95%CI=1.197-4.135). The Pro/Pro of *TP53* genotype was present in 11.8% of Graves-Basedow Disease patients (p<0.001), increasing significantly the risk to this disorder (OR=28.395; 95%CI=1.658-486.36).

Therefore, our studies indicate that the presence of HHV-6 and HHV-1 increase the risk to skin cancer, suggesting that this virus can play a role in the susceptibility to skin malignancies; the germline inheritance of P72 increases the risk to HHV-6 infection and there is a tendency to a higher risk of Graves-Basedow Disease development in patients that have both an HHV-6 infection and the proline allele of codon 72 of *TP53*.

# ***INTRODUÇÃO***

## **PARTE I- HHV E O CÂNCER DE PELE**

### **Câncer**

No mundo, o câncer é considerado a segunda maior causa de mortalidade depois das doenças cardiovasculares (Parkin et al., 2001). É comumente aceito que o câncer é o maior problema em regiões altamente industrializadas e vem se tornando um peso econômico significativo em países de baixos recursos em desenvolvimento, especialmente na América Latina.

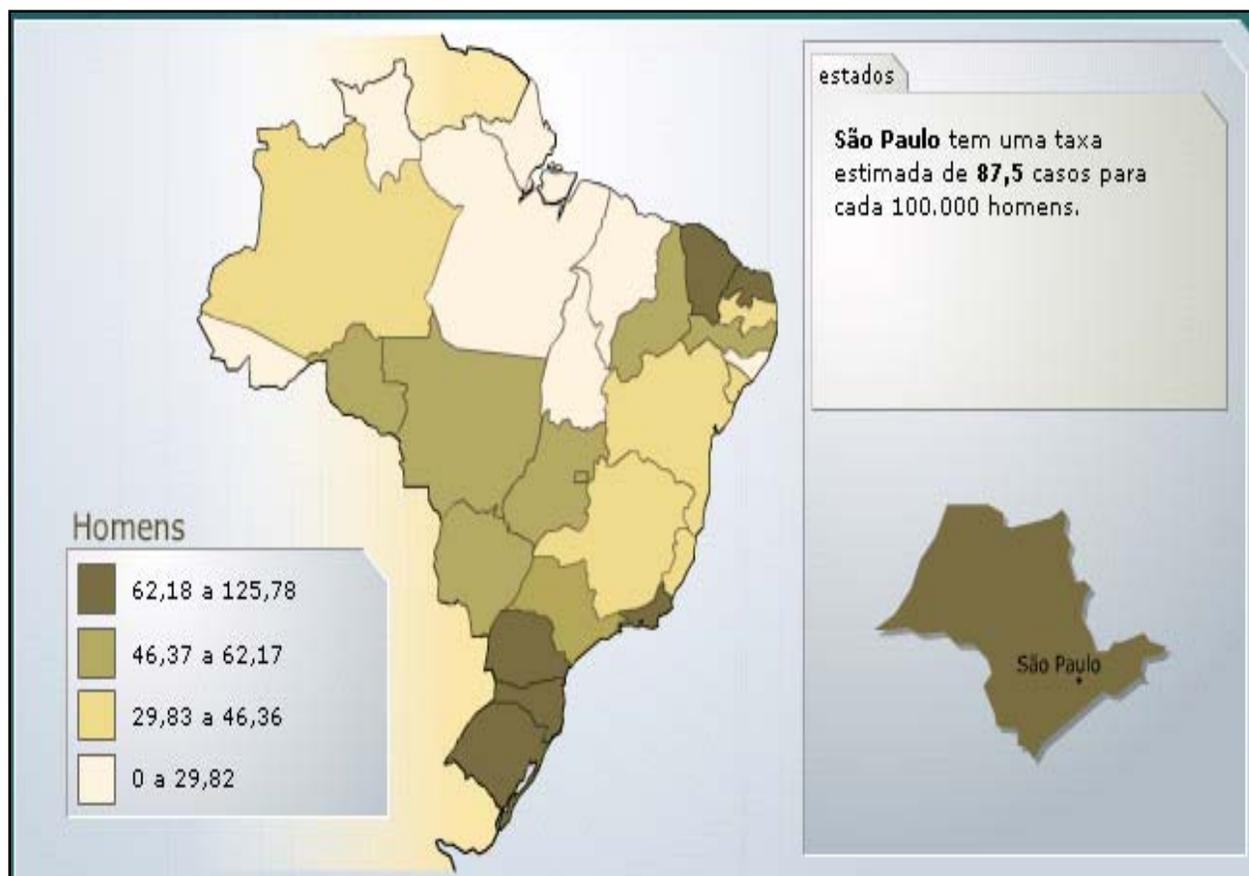
Devido a uma grande disparidade sociológica e econômica, o mapa global do câncer na América Latina mostra uma superposição de tumores que são freqüentes em países industrializados (mama, pulmão, próstata, cólon) e de tumores que são mais freqüentes em países em desenvolvimento (cérvix, esôfago, oral, bexiga, fígado) (Parkin et al., 1992, 2002). Enquanto que, anteriormente, o câncer estava associado a vários fatores de estilo de vida (em particular a dieta, uso de tabaco e falta de exercícios físicos), nos dias de hoje ele reflete a interação entre uma má nutrição (consumo excessivo de gorduras e açúcares, etc), regiões específicas de exposição ambiental (regiões de alta exposição solar, áreas contaminadas com agentes químicos, etc) e, em muitos casos, infecções virais (Steward e Kleihues, 2003). Contudo, essas tendências estão mudando rapidamente. Outros elementos de complexidade, como suscetibilidade genética, são preocupantes, assim como a existência de múltiplos grupos étnicos, alguns deles afetados por um forte efeito inicial que pode explicar um grupo regional de tumores raros. Portanto, o uso de biomarcadores pode ser particularmente útil para identificar o respectivo papel do meio ambiente, da biologia tumoral, do estilo de vida e de vários fatores de risco genéticos (de Moura Gallo et al., 2005).

### **Câncer de pele**

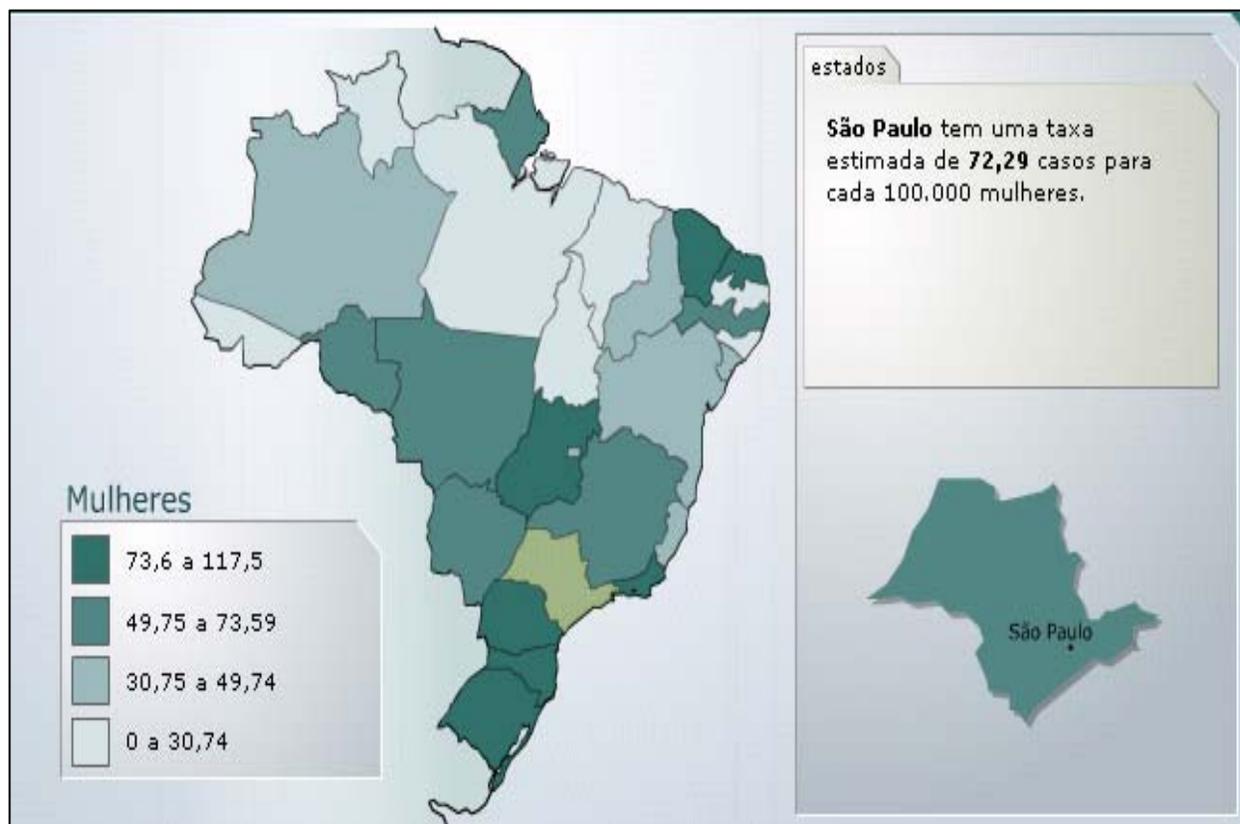
O câncer de pele é a malignidade mundial mais comum. Mais de 1 milhão de casos ocorrem todo o ano, com aumento progressivo desta incidência, cujos níveis têm chegado próximos a proporções epidêmicas, levando ao aumento da morbidade e dos gastos em muitos países, incluindo o Brasil (Almahroos e Kurban, 2004).

A variação da incidência do câncer de pele em diferentes grupos geográficos e étnicos sugere que fatores ambientais têm uma forte influência no processo tumorigênico (Figuras 1 e 2). De fato, há uma série de evidências clínicas, epidemiológicas e experimentais de que fatores de riscos ambientais, incluindo raios ultravioletas (UVR) e a radiação ionizante, vírus que transformam células, imunossupressão e uma crescente lista de carcinógenos químicos influem na incidência do câncer de pele (Almahroos e Kurban, 2004).

Diferenças individuais na suscetibilidade a carcinógenos têm um papel essencial no desenvolvimento de tumores esporádicos. A base bioquímica para esta suscetibilidade é relacionada a polimorfismos genéticos que normalmente ocorrem na população geral. São particularmente importantes aqueles que afetam genes envolvidos na predisposição a um câncer específico, genes que atuam na ativação metabólica ou detoxificação de genotóxicos ambientais e genes que agem no controle e reparo do DNA ou células danificadas (Clapper, 2000; Lichtenstein et al., 2000; Vineis, 2003).



**Figura 1-** Estimativa para 2006 para o câncer de pele não-melanoma no Brasil e no estado de São Paulo. Para os homens do estado de São Paulo a taxa para câncer não-melanoma é de 87,5 casos para cada 100 mil. Data da consulta: 12/06/2007. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=1>.



**Figura 2-** Estimativa para 2006 para o câncer de pele não-melanoma no Brasil e no estado de São Paulo. Para as mulheres do estado de São Paulo a taxa para o câncer não-melanoma é de 72,29 casos para cada 100 mil. Data da consulta: 12/06/2007.

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=1>.

## **Vírus**

Infecções virais têm emergido nos últimos anos como importantes causas de câncer. Alguns dos tumores relacionados a vírus são muito comuns, levando à suposição de que mais de 20% de todos os tumores têm uma etiologia viral, incluindo hepatite B e C e vírus relacionados à hepatocarcinomas, vírus Epstein-Barr, papilomavírus humano, vírus humano tipo 1 de leucemia de células T (Vousden e Farrell, 1994; Klein, 2002). Tumores virais se estabelecem em infecções humanas persistentes e o câncer é geralmente um efeito accidental das estratégias da replicação viral. Vírus são normalmente carcinógenos incompletos e sabemos que desempenham diferentes papéis na transformação celular (Butel, 2000). Há fortes evidências de que infecções virais podem afetar o sistema de reparo do DNA celular, supostamente permitindo o acúmulo de mutações no crescimento e regulação dos genes (Butel, 2000). Além disso, processos e reações associadas a uma resposta inflamatória induzida por vírus podem predispor ao câncer. Finalmente, também pode ocorrer que os vírus iniciem o processo de transformação através de um mecanismo mutagênico qualquer e em seguida, desapareçam sem deixar traços virais (Butel, 2000).

## **Herpesvírus**

### Nomenclatura e classificação

O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) criou uma nomenclatura que consiste na designação dos herpesvírus (HHV) por números arábicos seriais e a família ou sub-família do hospedeiro natural dos vírus (por exemplo, HHV-6, HHV-7, etc.), com base nas suas propriedades biológicas, como mostra a tabela 1 (Krueger e Ablashi, 2006).

**Tabela 1-** Tabela de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV).

Vírus	Nome	Sub-Família	Gênero
HHV-1	HSV-1		<i>Simplexvirus</i>
HHV2	HSV-2	<i>Alphaherpesvirinae</i>	
HHV3	VZV		<i>Varicellovirus</i>
HHV4	EBV	<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>
HHV5	CMV		<i>Cytomegalovirus</i>
HHV-6	HHV-6	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>
HHV7	HHV-7		
HHV8	KSHV	<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Rhadinovirus</i>

A infecção por HHV começa com a junção de partículas virais aos receptores de glicoproteínas na superfície da célula hospedeira. Essa junção tem sido identificada como ocorrendo graças ao receptor complementar CD46 (Lusso et al., 1994; Santoro et al., 1999). Após a ligação do receptor, a fusão do envelope viral com a membrana de uma vesícula endocítica leva à endocitose mediada pelo receptor do capsídeo. A cadeia do citoesqueleto, incluindo os componentes da dineína e dineína, é usada para transportar o capsídeo para os poros nucleares (Dohner et al., 2002). O DNA é injetado dentro do núcleo, enquanto que o capsídeo vazio permanece do lado de fora.

Dentro do núcleo, o DNA se torna circular e um de dois caminhos é iniciado:

- 1- o genoma viral pode ser mantido como um episossomo circular;
- 2- ou mantido como uma replicação latente resistente sem a produção de uma progene infecciosa.

É durante este segundo processo que os genes necessários para uma transformação celular são expressos. Um vírus latente pode ser reativado por vários fatores, como uma excessiva exposição aos UVR (Krueger et al., 1998), endotoxinas, aglutininas, esteróides, co-carcinógenos químicos (agentes promotores de tumor), outras infecções e o

aumento da produção de citocinas. Uma vez reativado o vírus, a atividade viral persistente pode ser mantida pela diminuição das respostas imunes resultantes de estresse ou outros fatores (Krueger et al., 1998).

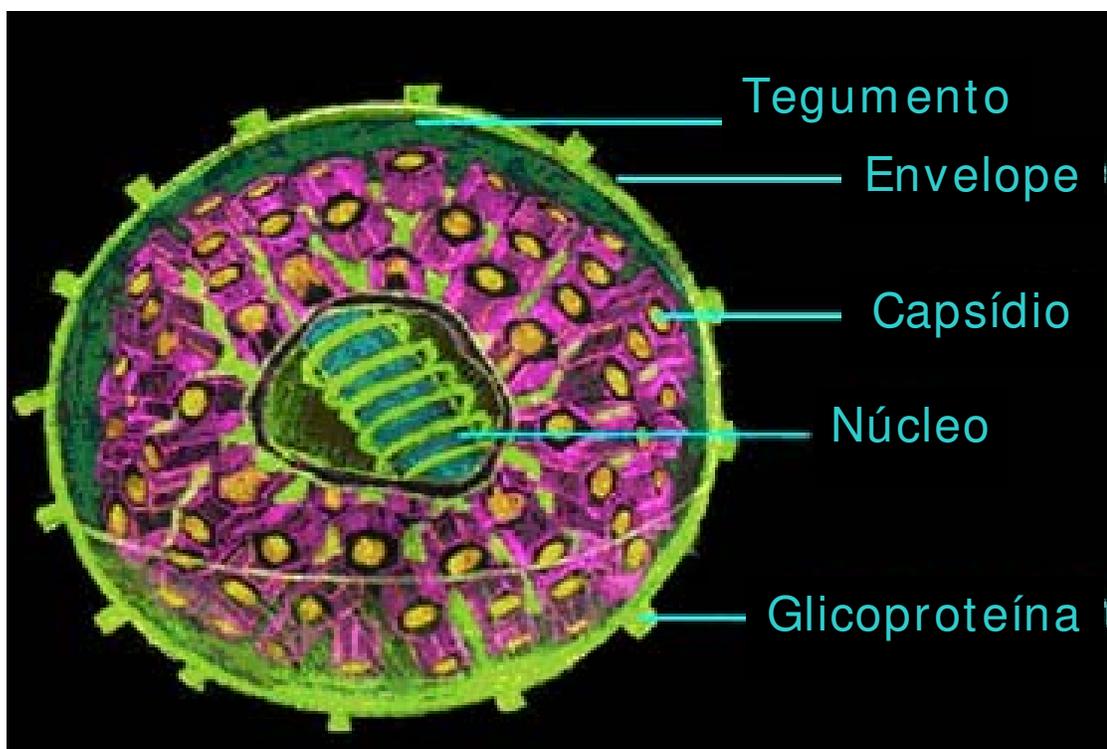
## **HHV-6**

### **Prevalência e estrutura**

Noventa por cento dos adultos são soropositivos para HHV-6 (Krueger e Ablashi, 2006). O HHV-6 possui duas variantes: HHV-6A e HHV-6B, ambas classificadas como membros da sub-família betaherpesvirinae (Braun et al., 1997; Campadelli-Fiume et al., 1999; Krueger e Ablashi, 2003; DeBolle et al., 2005). Uma característica não exclusiva dos membros da betaherpesvirinae é ter um hospedeiro restrito. O ciclo reprodutivo é longo e a progressão da infecção é lenta em cultura. Estes vírus podem permanecer em estado de latência em glândulas secretórias, células linfocitárias e outros tecidos. Esta sub-família também inclui o gênero Citomegalovírus (HCMV) e Roseolavírus (HHV-6A, HHV-6B e HHV-7) que são caracterizados pela replicação em células T. O genoma do HHV-6 consiste em uma grande (160-170 kb) e única cadeia (8-9 kb) composta por repetições diretas (DR). Algumas dessas seqüências de repetições (ORFs: seqüências de três nucleotídeos contínuos que não se duplicam) são encontradas em todos os HHV, enquanto que outras estão somente nos Roseolavirus e são únicos para o HHV-6. Os membros do gênero Roseola compartilham de uma característica padrão, uma estrutura de herpes virion: um capsídeo icosaédrico 90-110 nm de diâmetro, contendo 145-170 kb de um genoma de DNA dupla fita, e um tegumento envelopado por uma camada lipídica, como esquematizamos na figura 3. Comparado com o CMV e o HHV-7, o tegumento do HHV-6 é mais plano e acumula mais espaços entre o capsídeo e o envelope (Biberfeld et al., 1987; Braun et al., 1997).

No HHV-6, as ORFs são designadas de U1-U100 e estão localizadas nas regiões de repetições diretas de DR1-DR7 (Gompels et al., 1995). As regiões DR são ligadas por cópias de telômeros humanos repetidos, que têm sido vistos em vírus em estado de latência, possivelmente por estabilizar o genoma como um mini-cromossomo (Gompels e Macaulay, 1995; Gompels et al., 1995; Mrázek e Karlin, 1998; Dominguez et al., 1999).

As duas variantes de HHV-6, HHV-6A e HHV-6B são pouco distintas molecular e biologicamente, embora elas estejam relacionadas e compartilhem 90% de suas seqüências de nucleotídeos (Ablashi et al., 1993). Isto faz com que os vírus se diferenciem em 31%. O tropismo celular em HHV-6 é notadamente linfotrópico e neurotrópico, mas ele infecta e se replica na maioria das células humanas, tanto *in vivo* como *in vitro*, provavelmente pela sua presença no receptor CD46 (Gompels et al., 1995; Braun et al., 1997; Krueger e Ablashi, 2003; DeBolle et al., 2005). A replicação mais eficiente está em células T CD4<sup>+</sup>, mas cresce também em PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) ativados. Ambos, HHV-6A e HHV-6B, podem ser detectados em linfócitos, monócitos/macrófagos, PBMCs, glândulas salivares e Sistema Nervoso Central (oligodendrócitos) (Inoue et al., 1993; Braun et al., 1997; Clark, 2003; Krueger e Ablashi, 2003; DeBolle et al., 2005).



**Figura 3-** Figura ilustrativa dos herpesvírus e suas estruturas. Os HHV possuem um genoma envelopado, com DNA dupla fita coberto por um capsídio envolto pelo tegumento.

[http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects2000/Herpes/Titlepages/Table-of-Contents.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Herpes/Titlepages/Table-of-Contents.html).

## Mecanismos de infecção

O caminho de transmissão do HHV-6A não está claro, mas a transmissão de HHV-6B se dá através da saliva (Braun et al., 1997; Campadelli-Fiume et al., 1999; Clark, 2003). O genoma de HHV-6 é transcrito em três fases distintas: (i) primária imediata (IE), (ii) primária e (iii) tardia. O grau mais alto de divergência das seqüências é encontrado na região IE e isso pode servir para diferenciar as variantes HHV-6A e HHV-6B (Krueger e Ablashi, 2006).

Foi demonstrado ainda que HHV-6A induz a expressão do receptor de membrana celular CD4+ que predispõe a uma super-infecção por outros vírus, como o EBV e HIV (Krueger et al., 1990; Schonneck et al., 1991).

O HHV-6 e o HHV-7 compartilham uma relação com o HCMV, o protótipo dos betaherpesvírus, de forma que aproximadamente 2/3 dos genes codificam proteínas similares, enquanto que 1/3 codificam proteínas específicas de cada betaherpesvírus. O HCMV tem quase o dobro do tamanho do HHV-6, 230 kb e codifica uma família de genes de glicoproteínas ausentes em HHV-6 e HHV-7. Isto sugere uma seleção de genes, levando a uma vigilância distinta no controle imune (Dolan et al., 2004).

O genoma de HHV-6 está arranjado colinearmente e codifica aproximadamente 67% de proteínas em comum com o HCMV e 21% com todos os outros HHV, como demonstramos na figura 4 (Krueger e Ablashi, 2006).

A infecção latente tem sido demonstrada em monócitos/macrófagos assim como em células progenitoras da medula, similares às observadas em HCMV, e podem ser uma propriedade geral da infecção dos betaherpesvírus (Kondo et al., 1991; Gompels et al., 1993, 1994; Kempf et al., 1997; Yasukawa et al., 1997).

Estudos mostram que o HHV-7 também pode agir na reativação da latência de infectados por HHV-6 (Katsafanas et al., 1996).

Em adultos saudáveis, o DNA de HHV-6 foi demonstrado, *in vivo*, presente em muitos tecidos, incluindo tonsilas, glândulas salivares, tireóide, cérebro, fígado, rim e miocárdio (Fox et al., 1990; Corbellino et al., 1993; Luppi et al., 1994; Chan et al., 2001;

Grivel et al., 2001; Ozaki et al., 2001; Roush et al., 2001; Ishikawa et al., 2002; Donati et al., 2003; Harma et al., 2003).

A transcrição do gene do HHV-6 segue um modelo que caracteriza os HHV, com proteínas “immediate-early” (IE), proteínas expressas primária e tardiamente (Dockrell, 2003). As proteínas IE são as primeiras proteínas expressas seguindo uma entrada viral, independente de uma síntese de proteínas “de novo” e desempenham um papel crucial na iniciação da infecção e na infecção produtiva estabelecida, regulando a reativação da latência e ausência do reconhecimento imune (Krueger e Ablashi, 2006).

O locus das IE (IE-A) do HHV-6 se localiza em posição análoga ao locus da principal IE (MIE) do HCMV, que tem um papel bem conhecido na infecção viral (Papanikolaou et al., 2002).

				CD5				
HHV-6	1	.....MSKVV	<b>VGFL</b>	CVYGE	EEPSEECLALPRDTVQ.....	KEL 33		
HCMV	1	MTMDEQQSQAVAPVY	<b>VGFL</b>	LARYDQSPDEAELL	LLPRDVVEHHLHAQGGQ	50		
HHV-7	1	.....METVL	<b>VAGFL</b>	CVYDNDI	NDNFYLPRTI.....	QEEIN 34		
				CD2		CD4		
HHV-6	34	GSGNI	<b>PLNIN</b>	NEKATIGMV	RGLFDLEH	GLFCVAQIQSQIFMDIIRNI 83		
HCMV	51	PSLSVAL	<b>PLNIN</b>	DDTAVVGHV	AAMQSVRI	GLFCLGCVTSFRFLEIVRRA 100		
HHV-7	35	SGNGINI	<b>PLNIN</b>	NENAVIGTV	SSL.SVYS	IIVCFVARVQSKKEFLTIIKKI 83		
			His					
					CD3			
HHV-6	84	AGKSKLITAGSV	IEPLPPDPEI	ECLSSS	<b>FGLSLS</b>	SK...VIQDENLDG 129		
HCMV	101	SEKSELVSRGPV	.SPLQPKVVE	FLSGSY	<b>AGLSLS</b>	SRRCDDVHEAATSLSG 149		
HHV-7	84	AAKSKLITNTEE	.KTLPPDPEI	ECLNSI	<b>FGLSLS</b>	NR.....VGG 122		
					Ser			
					CD1	CD6		
HHV-6	130	KPF...	<b>FHHV</b>	SVCGV <b>GRR</b>	<b>PGT</b>	IAIFGREISWILDR <b>F</b> SCISESEK...RQVL 174		
HCMV	150	SETTP.	<b>FKH</b>	VALCSV <b>GRR</b>	<b>RGTL</b>	AVYGRDPEWVTQR <b>F</b> PDLTAADRGLRAQW 199		
HHV-7	123	NERDPF	<b>FKH</b>	VSICGV <b>GRR</b>	<b>PGT</b>	IAIFGRNLNWILDR <b>F</b> SSITEAEKEKILSTD 173		
			His					
					CD7			
HHV-6	175	EGVNVYSQGF	DENLFSADLY	<b>LLADS</b>	<b>LDTSYIRKRF</b>	<b>PKLQ</b>	<b>LDKQL</b>	<b>CGLS</b> . 223
HCMV	200	QRCGSTAVD	ASGDPFRSDSY	<b>LLGNS</b>	<b>VDALYIRERL</b>	<b>PKLRY</b>	<b>DKQL</b>	<b>GVVTE</b> 249
HHV-7	174	QSCVQFFAE	...EQFKVDLY	<b>LLADS</b>	<b>LDTSYIKVRF</b>	<b>PKLQ</b>	<b>SDKQL</b>	<b>SGIS</b> . 219
HHV-6	224	KCTYIKA	.SEPP					234
HCMV	250	RESYVKA	.SVSP					260
HHV-7	220	KSTYIKA	.SENL					230

**Figura 4-** Alinhamento das seqüências de proteínas do HCMV, HHV-6 e HHV-7. As seqüências nas caixas representam o domínio conservado nas proteases dos HHV. Dentro das regiões das caixas, os resíduos mostrados em vermelho/negrito representam aminoácidos que são compartilhados por esses vírus. O nível de aminoácido da protease do HHV-6 é 42% idêntico à protease do HCMV e 60% idêntico à protease do HHV-7. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/sdr/fig004sdr.htm>

Junto com o HHV-7, o HHV-6 é um HHV que mostra ter um tropismo distinto por células linfóides da linhagem T. Infecções produtivas, quase que invariavelmente, resultam em efeitos citopáticos e morte celular. Portanto, o HHV-6 também pode causar fenótipos importantes e mudanças funcionais quando a infecção não produtiva (que não produz proteínas e outros produtos virais) se estabelece, como visto em células fagocíticas mononucleares e células dendríticas. Características biológicas de HHV-6 têm sido evidenciadas, utilizando-se modelos *in vitro*, enquanto que estudos *in vivo* ainda estão limitados, devido à falta de modelos animais (Krueger e Ablashi, 2006).

Uma característica relacionada a ambas variantes de HHV-6 é que elas utilizam o CD46 como receptor, mas mostram diferente tropismo pela infecção de certas linhagens celulares humanas. Por exemplo, a linhagem imatura de células T HSB-2 é seletivamente susceptível a HHV-6A, mas não a HHV-6B (Ablashi et al., 1991).

O HHV-6 tem um alcance restrito de espécies susceptíveis e é essencialmente limitado a humanos e alguns primatas não humanos (Higashi et al., 1989). Camundongos também podem ser susceptíveis à infecção por HHV-6A e HHV-6B, mas a infecção permanece confinada a enxerto humano (Lusso et al., 1990, 1994).

Estudos em tropismo celular de HHV-6, particularmente da variante A, sugere que este vírus é amplamente imunotrópico por infectar muitas células, implicando na geração de efeitos na resposta imune. Desse modo, o HHV-6 pode afetar, direta ou indiretamente, ambos os modos de defesa, celular e humoral (Lusso et al., 1988. Takahashi et al., 1989).

As células fagocíticas mononucleares representam outro importante alvo para HHV-6A e HHV-6B, ambos *in vitro* e *in vivo* (Kondo et al., 1991; Burd e Carrigan, 1993), e tem-se sugerido que elas constituam um possível reservatório *in vivo* (Kondo et al., 1991).

Recém-nascidos e crianças adquirem infecção primária de HHV-6 desenvolvendo a Roséola ou *Exanthema Subitum*. Alguns desses sintomas identificados incluem diarreia, vômitos, congestão nasal, rash e febre alta. Esta infecção foi atribuída ao HHV-6B (Yamanishi et al., 1988). Complicações do Sistema Nervoso Central (CNS),

como convulsões, também foram atribuídas ao HHV-6 (Suga et al., 1993). O CNS é provavelmente o maior sítio de persistência do vírus. Ambas variantes têm sido detectadas em fluídos da coluna cerebral (Aberle et al., 1996; Hall et al., 1998). A exposição ao HHV-6 mostrou efeitos dramáticos e supressivos na maturação e crescimento de células precursoras da medula normal humana (Knox e Carrigan, 1992; Burd et al., 1993). Essas aplasias de medula são consistentes com relatos associados à infecção por HHV-6 em pacientes transplantados de medula (Drobyski et al., 1993).

Da mesma forma que outros HHV, o HHV-6 é capaz de aumentar a sua patogenicidade nos hospedeiros imunocomprometidos incluindo os transplantados. A taxa de reativação de HHV-6 em transplantados é extremamente alta e a infecção ativa, por sua vez, leva ao aumento de doenças por CMV, pneumonites e a rejeição de órgãos (Wainwright et al., 2001). Todas as evidências que existem sobre rim, coração, fígado e transplante de medula (com poucas exceções) apontam para o envolvimento do HHV-6B (Singh et al., 1995; Randhawa et al., 1997; Lautenschlager et al., 2000; Zerr et al., 2005a;).

Em relação ao seu papel em doenças auto-imunes, estudos feitos por Rotola et al. (2004) com pacientes portadores de esclerose múltipla (MS) mostram que 20% desses pacientes tiveram infecção ativa por HHV-6 no estágio primário da doença. Subgrupos de pacientes com síndrome da fadiga crônica (CFS) também apresentam indícios de infecção ativa por HHV-6, baseado em testes primários de antígeno-anticorpo e PCR (Patnaik et al., 1995; Ablashi et al., 2000).

### **Detecção dos HHV**

A detecção de anticorpos vírus-específicos em fluídos corporais, principalmente soro, ou a demonstração de significativo aumento nos títulos de anticorpos é comumente usada em diagnósticos virais. Crianças acima de dois anos de idade e adultos têm anticorpos IgG HHV-6-específicos detectáveis no soro, já que eles possuem uma significativa resposta imune à infecção. Isto ocorre na maioria dos subgrupos, mas em alguns pacientes pode falhar o reconhecimento de antígenos HHV-6, em particular, no caso de imunossupressão. A cinética de respostas a anticorpos e a pesquisa de anticorpos IgM pode ser útil na investigação de infecção aguda (Krueger e Ablashi, 2006).

Testes sorológicos como ensaios de imunofluorescência indireta com anticorpos (IFA) (Salahuddin et al., 1986; Linde et al., 1988; Lopez et al., 1988), ensaios de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA) (Saxinger et al., 1988; Chou e Scott, 1990; Sloots et al., 1996), western blot e outros ensaios de imunoblot (IBA) (Chen et al., 1992; LaCroix et al., 2000; Caselli et al., 2002; Zerr et al., 2005a) e testes de neutralização (NTA) (Asano et al., 1990; Yoshikawa et al., 2001; Yoshida et al., 2002a, b) contribuem para um melhor entendimento da patologia e promove desenvolvimento de estratégias antivirais.

Em pacientes transplantados renais, o título de anticorpo no soro tem sido encontrado aumentado em paralelo com o isolamento do vírus (Okuno et al., 1990; Herbein et al., 1996). O isolamento do vírus de leucócitos do sangue geralmente ocorre com duas a quatro semanas depois do transplante, enquanto que o aumento do título de anticorpos é observado mais tarde, um a dois meses depois do transplante (Yoshikawa et al., 1992).

Nos dias de hoje, é possível diferenciar entre as três possíveis fases da infecção por HHV-6: (1) infecção primária, (2) reinfecção ou reativação e (3) latência ou persistência usando testes moleculares. Um conceito importante é o fato de o DNA viral estar presente nas PBMC circulantes de todos os indivíduos infectados por HHV-6, independente da infecção ser recente ou não (Asano et al., 1991).

A detecção de DNA de HHV-6 em amostras de sangue, através de reações de PCR (Secchiero et al., 1995; Suga et al., 1995) tem muitas aplicações clínicas (Chiu et al., 1998; Osiowy et al., 1998; Akhyani et al., 2000; Nitsche et al., 2001; Tomsone et al., 2001; Berti et al., 2002), incluindo análises de infecção/reativação viral em pacientes transplantados de medula (Zerr et al., 2005a).

### **Reativação viral**

A reativação por si só não causa doenças, a menos que o vírus persista e se replique por longos períodos de tempo devido à deficiência imune, doenças auto-imunes sistêmicas ou crescimento tumoral. Duas principais condições explicam a reativação patogênica de HHV-6 com reinfecção de tecidos: a estimulação anormal de células

carregando genomas virais e controle defeituoso do hospedeiro, quanto à replicação e difusão do vírus (Hall et al., 2006).

O HHV-6 (preferencialmente o subtipo A) e ou o aumento da carga de DNA viral foi encontrado em certos linfomas malignos, incluindo subtipos de Doença de Hodgkin (Krueger et al., 1989; Torelli et al., 1991; Di Luca et al., 1994; Braun et al., 1995; Hallas et al., 1996; Razzaque et al., 1996; Bandobashi et al., 1997; Luppi et al., 1998; Hermouet et al., 2003).

HHV-6 sofre reativação freqüentemente em pacientes transplantados renais e hepáticos com seqüelas patológicas quando existe uma concomitante infecção por HCMV (Clark et al., 2003; Feldstein et al., 2003; Yoshikawa, 2003). É importante notar que o HHV-6 também pode ativar outras infecções virais, como aquelas induzidas por EBV, CMV, HIV-1, papillomavírus e parvovírus. Infecções ativas aparecem especial e freqüentemente com outros herpesvírus (CMV, EBV, HHV-7) assim como com HIV-1 (Hall et al., 2006).

### **HHV-1**

O HHV-1 é um herpesvírus que pertence à família alfa herpesvírus. É um vírus neurotrópico que estabelece latência em neurônios sensoriais primários (Lachmann, 2003).

Tanto HSV-1, quanto o HSV-2, são responsáveis pela infecção por herpes simples oral primária com 75-90% dos casos pelo HSV-1 (Corey, 1998; Kesson, 1998). A transmissão ocorre via contato direto com secreção contaminada de indivíduos infectados (Greenberg, 1996; Christie et al., 1998; Glick et al., 1993). A manifestação clínica geralmente observada na infecção primária de HSV é a gingivoestomatite herpética aguda. Após o período de incubação de 1-26 dias, sinais inespecíficos iniciais e sintomas de febre moderada a alta, astenia, irritabilidade, cefaléia, linfadenopatia cervical, entre outros são observados (Corey e Spear, 1986; Vestey e Norval, 1992; Christie et al., 1998; Emmert, 2000).

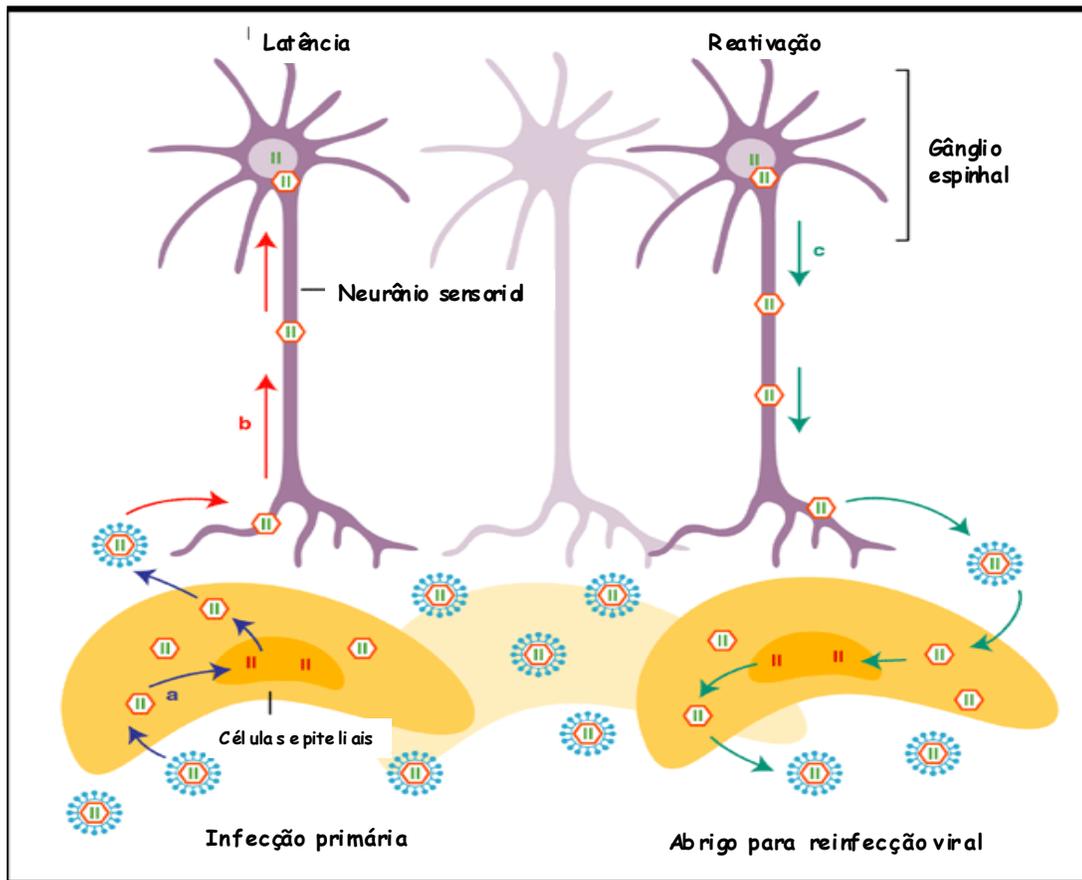
Assim como o HHV-6, o HSV-1 também possui habilidade de estabelecer latência e uma posterior reativação (Figuras 5 e 6). No estado latente, o vírus vive em um estado protegido imunologicamente, não se replicando, permanecendo nos neurônios

(Miller et al., 1998; Dalkvist et al., 1995). O sítio mais freqüente de latência para o HSV-1 é o gânglio trigêmeo (Miller et al., 1998), mas outros sítios potenciais incluem gânglios do nervo vago e cérebro (Miller et al., 1998; Scott et al., 1997). A reativação viral nem sempre resulta em recorrência clínica como evidenciado pelo fato de um reservatório viral ter sido observado em 2-9% da população assintomática (Miller et al., 1998; Scott et al., 1997; Christie et al., 1998).

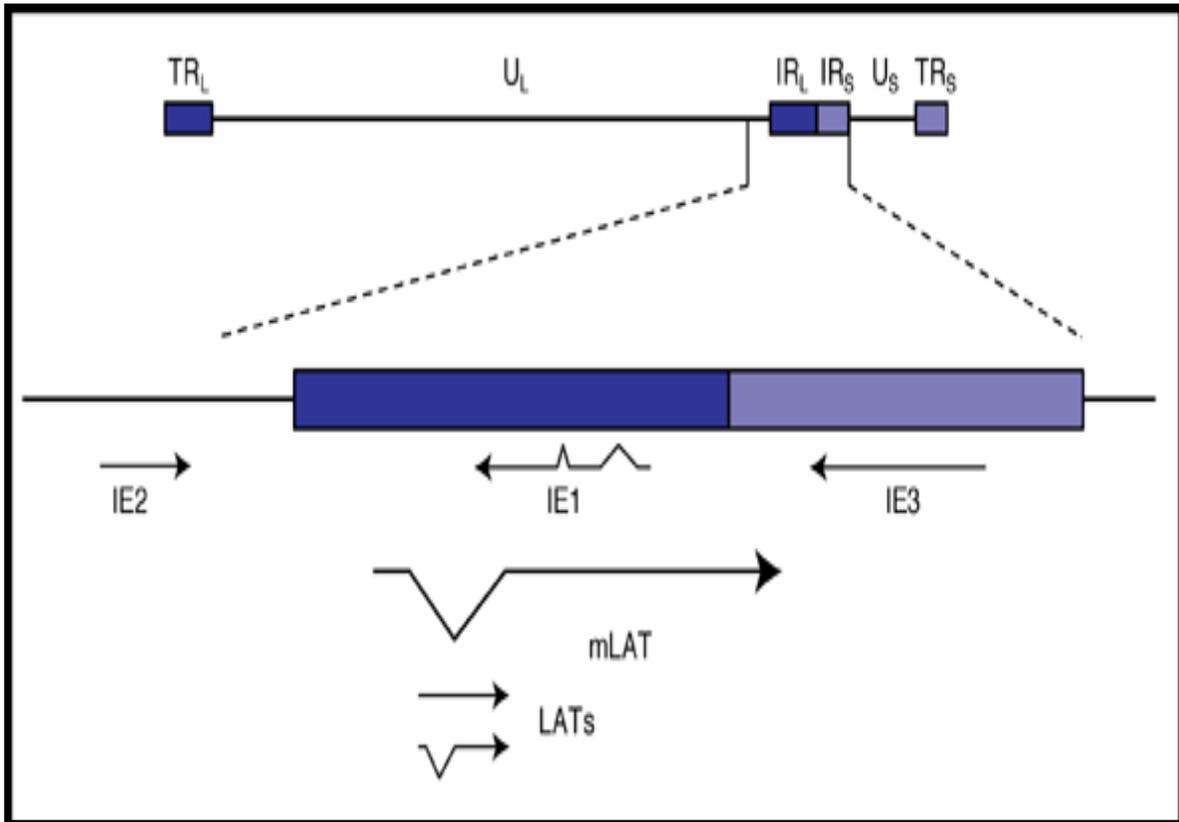
Numerosos fatores estão associados com a recorrência de HSV-1, incluindo: exposição à luz solar, trauma, menstruação, febre, imunossupressão, descompressão do nervo trigêmeo e irritação por instrumentos dentais (Eversole, 1994; Dalkvist et al., 1995; Christie et al., 1998; Hijikata e Tsukamoto, 1998; Emmert, 2000).

Testes sorológicos para HSV-1 (Greenberg, 1996), culturas virais (Corey e Spear, 1986; Greenberg, 1996; Riley, 1998; Patton e Van der Horst, 1999) e reação de PCR (Riley, 1998) são utilizados no diagnóstico da infecção.

A reativação da latência de HSV é amplamente reconhecida como causa de úlceras orais observadas durante a quimioterapia, transplante de medula, uso de terapias anti-rejeição de órgãos pós-transplantes (Meyers, 1985; Gold e Corey, 1987; Epstein et al., 1990).



**Figura 5-** Ciclo de vida do Herpes Simples. (a) O HSV é mostrado submetido no ciclo lítico (entrada, sem revestimento, transcrição viral e replicação do DNA no núcleo, partícula reunida, saída da célula) em células epiteliais da pele devido à infecção primária. (b) Alguns vírus entram no neurônio sensorial terminal e vão retrogradamente para o núcleo onde estabelecem latência. (c) O período de reativação resulta no transporte de partículas virais, abrigando o neurônio e reinfectando as células epiteliais, as quais levam a uma proteção assintomática ou lesão recorrente. <http://www.expertreviews.org/03006987h.htm>



**Figura 6-** Organização do genoma do HHV-1, mostrando a origem da latência-associada a transcritos. O gene para a latência-associada a transcritos (LATs) é diplóide e localizado na região de repetição flanqueadora de seqüências únicas longas (U<sub>L</sub>) do genoma (DNA dupla-fita) perto dos genes IE1, IE2 e IE3; o menor (primário) transcrito de latência-associada (mLAT; ~8.3 kb) é transcrito de fitas opostas da IE1. <http://www.expertreviews.org/03007002h.htm>

## PARTE II- CÂNCER DE PELE E OS GENES DO SISTEMA GST

### GSTs

O câncer é um processo evolutivo causado pela interação gene - meio ambiente (Vineis, 2003). Somos constantemente expostos a uma crescente lista de compostos químicos carcinogênicos, vírus transformadores de células, exposição à radiação UV e a radiação ionizante, entre outros agentes tóxicos encontrados no meio ambiente (Schottenfeld e Beebe-Dimmer, 2005). Além disso, compostos eletrofílicos, radicais livres e uma série de produtos do nosso próprio metabolismo podem causar danos as células quando inapropriadamente metabolizados, inadequadamente eliminados ou produzidos em excesso (Vineis, 2004; Carbone e Pass, 2004). Estima-se que as influências ambientais contribuam com mais de 80% dos fatores envolvidos no surgimento do câncer esporádico (Palli et al., 2000). Acredita-se que seres humanos chegam a consumir 1,5 gramas de pesticidas naturais por dia, na forma de fenóis provenientes de plantas e flavonóides de alimentos, entre outras substâncias tóxicas (Ames et al., 1990; Ames e Gold, 1990; Goldman e Shields, 2003; Thilly, 2003). Podemos incluir nas influências ambientais os comportamentos sociais como tabagismo, consumo de alimentos e bebidas, poluição, agentes químicos industriais, entre outros (Palli et al., 2000).

O contato com esses agentes carcinogênicos é provavelmente responsável por uma elevada frequência de mutações no DNA (Nielsen, et al., 1996; Bodiwala et al., 2003; Goldman e Shields, 2003; Thilly, 2003). Indivíduos expostos a poluentes do ar, como oficiais de polícia, motorista de ônibus, vendedores de rua e residentes em áreas urbanizadas altamente poluídas tendem a apresentar elevada frequência de modificações no DNA (Nielsen et al., 1996). Existem evidências de que a radiação ionizante produz câncer de tireóide e de que a radiação UV predispõe ao câncer de pele e se relaciona de forma clara com o melanoma maligno (Ward, 2002). Além dos agentes físicos e químicos, agentes biológicos têm sido reconhecidos como importantes desencadeadores do processo de tumorigênese. O papiloma vírus tem sido identificado em 90% a 95% dos carcinomas de colo uterino, embora a infecção viral sozinha não pareça ser suficiente para iniciar o processo de transformação maligna do epitélio cervical (Kim et al., 1997; Zur Hausen, 2001). Numerosas evidências indicam que a presença do vírus predispõe à

alterações genéticas adicionais, como já mencionamos (Kim et al., 1997; Zur Hausen, 2001).

A probabilidade do desenvolvimento do câncer depende da resposta natural de cada organismo às diferentes exposições a agentes agressores diversos. Os seres humanos possuem diferente suscetibilidade aos diversos agressores ambientais, relacionada a polimorfismos genéticos que ocorrem na população, em especial nos genes envolvidos na predisposição específica para câncer, ativação metabólica ou detoxificação de agentes tóxicos ambientais, controle e reparo de DNA ou dano celular (Lichtenstein et al., 2000; Autrup, 2000; Clapper, 2000; Vineis et al., 2001; Vineis, 2003). Assim, uma suscetibilidade maior ou menor ao câncer advém da inter-relação entre os fatores ambientais químicos, físicos e biológicos de agressão às células, chamados de fatores xenobióticos (nome atribuído a agentes químicos não-nutritivos) e fatores genéticos que cada um de nós possui, e que são capazes de neutralizar tais carcinógenos ambientais.

Muitos genes polimórficos que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de radicais livres e biotransformação de carcinógenos têm sido investigados como possíveis fatores de risco para câncer. O Sistema Glutationa S-transferase (GST) é bem conhecido (Mannervik, 1985; Vineis, 2003). Ele consiste de um grupo grande e multigênico de enzimas detoxificantes, cuja atividade catalisa a conjugação de componentes tóxicos e mutagênicos com a glutathione, essencial para a proteção celular (Mannervik, 1985; Knudsen et al., 2001). Quatro classes de isoenzimas têm sido relacionadas com a malignidade humana: *mu* (*GSTM*), *pi* (*GSTP*), *ômega* (*GSTO*) e *teta* (*GSTT*). As enzimas GST estão implicadas na detoxificação de lipídios e produtos de DNA de estresse oxidativo UVR-derivados e variantes alélicas em GSTs que estão associadas com várias outras doenças relacionadas com o estresse oxidativo, incluindo o câncer de pele (Lear et al., 2000; Kanetsky et al., 2001; Carless et al., 2002; Kerb et al., 2002; Fryer et al., 2005).

Mais recentemente, polimorfismos genéticos de *GSTO* foram descritos, incluindo o *GSTO2 NI42D*, uma variante na base 424 (Whitbread et al., 2003). Estes polimorfismos têm sido relatados para uma baixa capacidade de enzimas correspondentes metabolizarem arsênico, um bem conhecido carcinógeno químico (Whitbread et al., 2003; Tanaka-Kagawa et al., 2003).

### PARTE III- INDIVÍDUOS IMUNOSSUPRIMIDOS E SUA RELAÇÃO COM O GENE *TP53* E COM OS HHV

Pacientes transplantados renais apresentam um aumento de risco para o desenvolvimento de muitas infecções virais. Como os HHV são distribuídos ao longo da população humana e persistem no hospedeiro, seguido de uma infecção viral, a maioria dos receptores de transplantes provavelmente abrigará múltiplas viroses latentes. O estado imunossupressivo em pós-transplantados favorece a reativação viral. Além disso, pacientes que escapam de uma infecção no momento do transplante enfrentam o risco de adquirir CMV ou outro HHV, a partir de órgãos doados ou de produtos do sangue, quando recebem agentes imunossupressivos para prevenir ou tratar a rejeição (Pass, 2000). Estas infecções virais podem ser graves e perigosas para os receptores de transplantes.

HHV, assim como todos os agentes infecciosos que requerem a replicação de seu próprio genoma no núcleo do hospedeiro têm que superar a barreira apresentada pelo gene supressor tumoral *TP53*. O *TP53* normal (selvagem) mantém a integridade do genoma por causar uma pausa no ciclo celular até que o dano tenha sido reparado ou por induzir a apoptose em células impossíveis de se reparar ou que representam um risco para o organismo (Lane, 2002).

As terapias imunossupressivas mais efetivas têm sido estabelecidas diminuindo a taxa da rejeição aguda depois do transplante renal. Infelizmente, a imunossupressão mais agressiva expõe o receptor de transplante renal a complicações infecciosas mais frequentes.

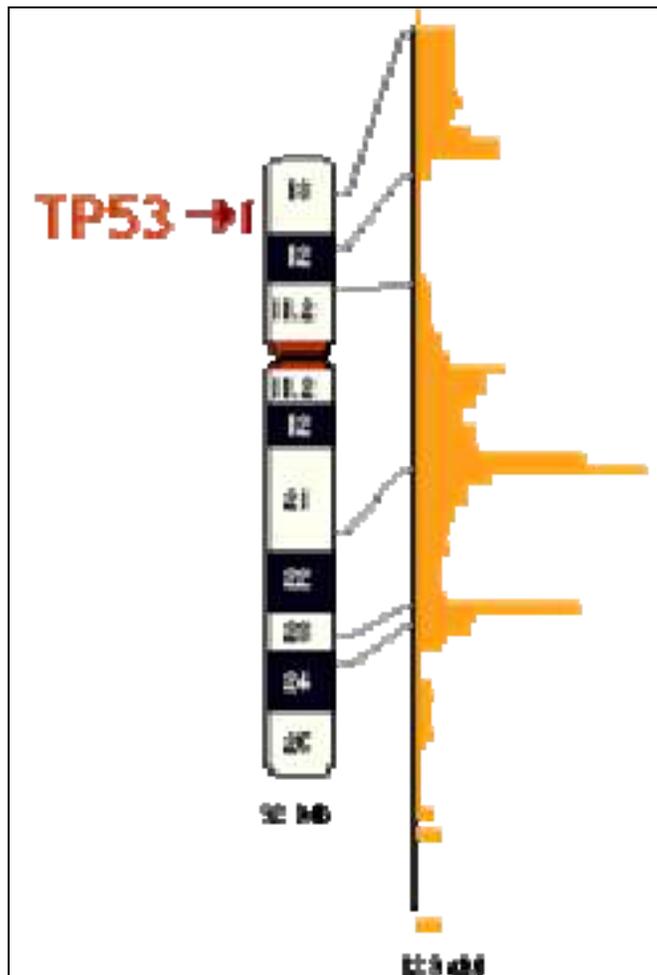
O *TP53* é um gene supressor tumoral que está envolvido na carcinogênese e nas funções da proteína p53, vistos como fundamentais no desenvolvimento do câncer (Hanahan e Weinberg, 2000). O gene humano *TP53* está localizado no cromossomo 17p13.1, medindo 20 kb (figura 7). Contém 11 éxons e o primeiro não é codificante (Kaghad et al., 1997).

A proteína p53 está expressa em quase todos os tecidos como uma proteína constitutivamente reprimida (de Moura Gallo et al., 2005). Uma vez ativada, p53 regula a expressão de muitas classes de genes, através de seqüências específicas de ligação com

DNA ou através de interações proteína-proteína. Sua regulação resulta em efeitos antiproliferativos permitindo a preservação da integridade genômica (Cadwell e Zambetti, 2001).

Alterações de *TP53* em tumores humanos incluem a perda de alelos, genes mutados (a maioria missense) e a inativação de proteínas por apreensão por vírus ou proteínas celulares. As alterações mais frequentes são mutações nas seqüências codificantes as quais são encontradas em quase todos os tipos de tumores humanos (de Moura Gallo et al., 2005). A natureza, posição e prevalência relativa das mutações variam de acordo com os tipos de tumores e grupos de população estudados (Hainaut e Hollstein, 2000). As mutações *TP53* também podem resultar em uma superexpressão de proteína mutante, a qual está envolvida na progressão do câncer (de Moura Gallo et al., 2005).

Somente dois polimorfismos, com substituição de serina por prolina no resíduo 47, e de arginina por prolina no resíduo 72 do éxon 4 de *TP53*, alteram as seqüências de aminoácidos de p53 (de Moura Gallo et al., 2005).



**Figura 7-** Gene *TP53* localizado na posição 13.1 do braço curto do cromossomo 17.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE96/gene.cgi?TP53>

### **Códon 72**

Características estruturais de *TP53* (códon 61-94) têm sido bem preservadas através da evolução, exceto no éxon 4, onde um polimorfismo comum resulta em prolina ou arginina na posição 72 do aminoácido (Ara et al., 1990). Este polimorfismo ocorre num domínio rico em prolina do éxon 4, o qual é necessário para a proteína induzir completamente à apoptose (Dumont et al., 2003).

O polimorfismo de *TP53* no códon 72 Arg/Pro tem sido associado, às vezes controversamente, a vários tipos de malignidades humanas, como câncer de mama (Langerod et al., 2002; Buyru et al., 2003;), cervical (Storey et al., 1998; Arbel-Alon et al., 2002) e de pulmão (Papadakis et al., 2002), carcinoma cutâneo de células escamosas em pacientes transplantados renais (Cairey-Remonnay et al., 2002) e em câncer esporádico de tireóide (Boltze et al., 2002; Granja et al., 2004b). Acredita-se que não somente *TP53* mutado, mas também, variantes funcionais de *TP53* podem afetar o desenvolvimento tumoral (Rogounovitch et al., 2006).

### **Códon 47**

Além do polimorfismo do códon 72 de *TP53*, o códon 47, também localizado no éxon 4 de *TP53*, é funcionalmente significante. Este códon codifica prolina em sua forma normal, mas num pequeno subgrupo de indivíduos ele pode codificar serina, havendo uma troca de bases de uma citocina por uma timina (CCG-TCG) (Li et al., 2005).

Em um estudo da variante polimórfica serina 47 (S47), o polimorfismo S47 foi encontrado em menos de 5% numa população de afro-americanos e não foi encontrado entre caucasianos (Felley-Bosco et al., 1993). Uma análise funcional preliminar falhou em revelar diferenças entre S47 e a forma selvagem de p53 (Felley-Bosco et al., 1993). Mas não se sabia que a fosforilação do resíduo adjacente, serina 46, era crítico para a habilidade de *TP53* em induzir a apoptose (Li et al., 2005). Uma das kinases que catalisam diretamente a fosforilação da serina 46 é a prolina-direta-kinase p38 MAPK. A importância da fosforilação da serina 46 para a indução da apoptose pelo *TP53* é epitomizada pelos achados de que a mutação da serina 46 por alanina, incubação por inibidores químicos específicos de p38 MAPK e a superexpressão de proteínas que inibem a p38 MAPK inibem a apoptose p53-dependente (Bulavin et al., 1999; Oda et al., 2000; Sanchez-Prieto et al., 2000; Takekawa et al., 2000; Okamura et al., 2001; Bulavin et al., 2002). Significativamente, o polimorfismo da serina 47 de *TP53* substitui o resíduo da prolina necessário para a fosforilação da serina 46 pela prolina-direta-kinase. Isto aumenta a capacidade que a variante de S47 tem em diminuir a fosforilação na serina 46 e causar prejuízo na habilidade apoptótica de *TP53* (Li et al., 2005).

## **PARTE IV- HHV NA DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES E SUA RELAÇÃO COM A HABILIDADE APOPTÓTICA DE TP53**

A Doença de Basedow-Graves (DG) é a causa mais comum de hipertireoidismo em todo o mundo, embora sua frequência seja maior em regiões onde há suficiência de iodo na alimentação do que em locais onde há carência deste elemento. A sua incidência é mais elevada na faixa etária de 20-40 anos, com prevalência maior nas mulheres, como no caso de outras doenças auto-imunes. A DG, assim como a tireoidite auto-imune destrutiva ou tireoidite de Hashimoto, tem origem em fatores ambientais e genéticos (Tunbridge et al., 1977).

O principal mecanismo de desenvolvimento da DG é o estímulo do receptor de TSH por anticorpos específicos direcionados contra ele. Estes anticorpos, denominados TRAB, ligam-se ao receptor de TSH provocando estimulação da tireóide para a produção de quantidades excessivas de hormônios tireoidianos (Wang e Crapo, 1997).

Como a herança da doença é atribuída a múltiplos genes, a associação de diversos polimorfismos específicos ou de mutações em um mesmo indivíduo seria necessária para seu desenvolvimento. Alguns desses polimorfismos são: dos genes TAP1 e TAP2 do sistema HLA; do receptor de antígenos de linfócitos T-helper (TCR); do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e das citosinas (Gough, 2000; Weetman, 2000).

O diagnóstico da DG tem base principalmente no seu quadro clínico, pois a presença de três das quatro principais características da doença já pode levar à certeza da enfermidade. Estas características são: hipertireoidismo, bócio difuso, oftalmopatia e mixedema pré-tibial. As dosagens de TSH e T<sub>4</sub> livre confirmam a tirotoxicose (Weetman, 2000). Pode-se dosar o T<sub>3</sub> livre como complemento do diagnóstico, pois algumas vezes este é o primeiro hormônio a se elevar (Orgiazzi, 2000).

O tratamento da DG pode ser feito com o uso de drogas antitireoidianas, iodo radioativo ou cirurgia. O objetivo é a cura do hipertireoidismo e da tirotoxicose, já que ainda não há como intervir no processo de autoimunidade (Singer et al., 1995). No Brasil,

as duas drogas antitireoidianas comercialmente disponíveis são o propiltiouracil e o metimazol. Na Europa existe também o carbimazol (Cooper, 1999).

Em se tratando de fatores ambientais que podem estar relacionados ao aparecimento da DG podemos citar o controle da ingestão de iodo na dieta (Koutras et al., 1986), participação de vírus e bactérias (Tommer e Davies, 1993), estresse (Chrousos, 1995; Chiovato e Pinchera, 1996) e o fumo (Prummel e Wiersinga, 1993).

Um processo infeccioso pode iniciar um fenômeno auto-imune, se o agente infectante possuir antígenos semelhantes ao do hospedeiro para induzir uma reação cruzada. O agente mais estudado é a bactéria *Yersinia enterocolitica*, já que a imunização de animais com a proteína de superfície da bactéria induz a formação de anticorpos que apresentam reação cruzada com o domínio extracelular do receptor de TSH (Luo et al., 1993). O envolvimento de infecções virais na patogênese de doenças auto-ímmunes da tireóide foi demonstrado em animais e humanos (Werner e Gelderblom, 1979; Ciampolillo et al., 1989; Lagaye et al., 1992; Wick et al., 1992; Tomer e Davies, 1995).

É sabido que agentes infecciosos induzem doenças devido a um dano tecidual direto (via secreção de toxinas). Esses agentes têm um papel na indução de processos não-infecciosos, incluindo várias malignidades (por exemplo o vírus Epstein-Barr e o linfoma de Burkitt, o HTLV-1 e a leucemia de células T adultas, o HIV e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, a *Helicobacter pylori* e a úlcera peptídica e doenças auto-ímmunes) (Tomer e Davies, 1993). Agentes infecciosos são causa de uma variedade de doenças auto-ímmunes, como as doenças auto-ímmunes da tireóide, por exemplo (Tomer e Davies, 1993). Clinicamente a doença auto-ímmune da tireóide tem muitas características típicas de infecção viral como ausência de leucocitose e fadiga. Diferentes vírus estão associados a uma tireoidite subaguda como o vírus da influenza, adenovírus, EBV e o vírus Coxsackie (Volpe, 1979).

## ***OBJETIVOS***

1. Investigar o papel do HHV-6 e HHV-1 na suscetibilidade ao câncer de pele esporádico.
2. Verificar a influência e potenciais interações de genes que codificam quatro importantes enzimas GST antioxidantes na suscetibilidade ao câncer de pele em brasileiros.
3. Investigar a influência do códon 72 e códon 47 do gene *TP53* na suscetibilidade a infecção por HHV-6 e HHV-1 em pacientes imunossuprimidos pós-transplante.
4. Investigar a relação entre a infecção por HHV-6, através do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* e a suscetibilidade à Doença de Basedow-Graves.

***MATERIAIS E MÉTODOS***

Todos os estudos foram prospectivos, de tipo caso-controle e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas e Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas e da Universidade Estadual de São Paulo-Botucatu (UNESP). Um termo de consentimento informado assinado foi obtido de todos os indivíduos envolvidos.

Devido à alta heterogeneidade da nossa população, pacientes e controles foram classificados em brancos e não-brancos de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2003). Dados acerca das condições saudáveis gerais e históricos médicos com ênfase em condições médicas prévias e/ou correntes, especialmente transplantes de órgãos, terapias imunossupressoras, outras malignidades e infecção pelo HIV foram obtidos através de entrevistas, com a utilização de um questionário estruturado administrado pelo mesmo entrevistador (médico) que também fez um exame físico cuidadoso.

### **Identificação do HHV-6 e HHV-1 em câncer de pele**

Para o estudo dos herpesvírus HHV-6 e HHV-1 em pacientes com câncer de pele, foram avaliados 120 indivíduos adultos (56 mulheres e 64 homens, 11-92 anos,  $63,8 \pm 15,7$  anos) consecutivamente encaminhados ao Ambulatório de Dermatologia Clínica e Cirúrgica da UNESP devido a problemas de pele. Havia 51 Carcinomas de Células Basais (BCC), 41 Carcinomas de Células Escamosas (SCC) e 9 Melanomas Malignos (MM). Dezenove lesões foram classificadas como benignas: 5 ceratoacantomas, 12 ceratoses actínicas e 2 nevos melanocíticos. Margens das excisões cirúrgicas foram desenhadas pelo cirurgião que coletou todos os tumores (Hamilton O. Stolf) de acordo com os devidos guias (Telfer et al., 1999; Motley et al., 2002; Newton-Bishop et al., 2002). Foram obtidas amostras de lesões de cada paciente e também de uma porção normal adjacente da pele. Tipos de tumores e graus de diferenciação foram obtidos de registros cirúrgicos e patológicos. Os diagnósticos foram todos revistos e confirmados por patologistas experientes da UNESP.

Um subgrupo de 25 pacientes com lesões de pele foram considerados imunocomprometidos devido a transplantes de órgãos (n=11 casos), uso de terapias imunossupressoras (n=9 casos) ou outras malignidades avançadas (n=5 casos). Houve 9 BCC, 10 SCC, 1 MM e 5 lesões benignas entre estes pacientes.

Um grupo-controle, de doadores de pele saudáveis da população geral da nossa região, sem nenhuma condição anormal de pele foi obtido. Procurou-se obter um grupo controle comparável com o grupo de pacientes com lesões cutâneas em relação à proporção de sexo, idade e etnia recrutando 41 voluntários saudáveis como descrito na tabela 2. Entretanto, doadores de pele normal, mais idosos, foram difíceis de serem obtidos.

Amostras de tumor foram obtidas de uma porção central do tumor para se minimizar a possibilidade de uma contaminação por tecido normal. A seleção dos tecidos apropriados foi baseada na avaliação macroscópica no momento da coleta. Também foram obtidas amostras autólogas normais adjacentes de tecidos de pele. O DNA das amostras foi obtido utilizando-se o método padrão de digestão com proteinase K e extração com fenol-clorofórmio.

**Tabela 2-** Casuística dos pacientes, grupo de indivíduos controle e grupo dos pacientes imunossuprimidos envolvidos no estudo dos herpesvírus e câncer de pele.

HISTOPATOLOGIA	IMUNOSSUPRIMIDOS E CÂNCER	CÂNCER	TOTAL
<b>BENIGNOS</b>	5	14	19
<b>BCC</b>	9	42	51
<b>SCC</b>	10	31	41
<b>MM</b>	1	8	9
<b>CONTROLES</b>	0	0	41

As seqüências de HHV-1 foram obtidas por PCR, utilizando um par de primers que amplificou uma seqüências alvo de 199 bp. A PCR foi feita para um volume final de 25 µl, contendo: 200 ng de DNA, 10 µM de cada primer, 50 mM de KCL, 20mM de Tris-HCL (pH 8,0), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dinucleotídeo trifosfato e 3,0 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies GIBCO BRL). A amplificação foi feita com 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60,5°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos, com uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para amplificar as seqüências de HHV-6, foram utilizados dois pares de nested primers. O

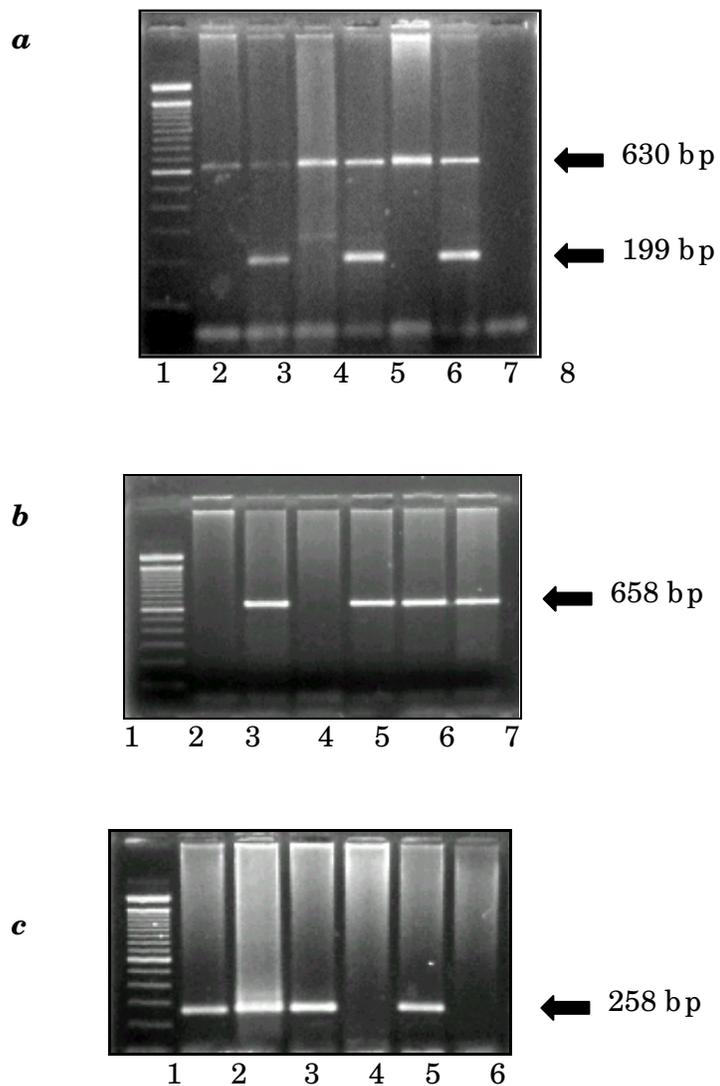
primeiro par foi feito para amplificar uma alta seqüências conservada correspondendo ao gene da proteína principal do capsídio. Isto consistiu em um par de primers externos, A1 e A2, e um par de primers internos, A3 e A4. Os primers A1 e A2 definiram uma seqüências-alvo de 520 bp, enquanto que A3 e A4 amplificaram um fragmento de 258 bp. O segundo par de primers foi designado para amplificar a região que codifica o gene da proteína do tegumento, e consistiu de um par de primers externos, B1 e B2, e um par de primers internos, B3 e B4. Os primers B1 e B2 definiram uma seqüência alvo de 834 bp, enquanto que B3 e B4 amplificaram um fragmento de 658 bp. Todas as reações de PCR foram feitas em um termociclador programável (Perkin-Elmer), com um volume final de 25 µl contendo: 200 ng de DNA, 25 µM de cada primer, 50 mM de KCL, 20mM de Tris-HCL (pH 8,0), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dinucleotídeo trifosfato e 3,0 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies GIBCO BRL). Os primers A1/A2 tinham uma temperatura de anelamento de 56°C. Depois de 35 ciclos, 2 µl do produto desta PCR foram usados como molde para uma segunda amplificação utilizando os primers A3/A4 nas mesmas condições. Quando o par B de nested primers foi utilizado, a primeira reação foi feita com temperatura de anelamento de 58°C para os primers B1/B2 em 30 ciclos. Depois da primeira amplificação, 2 µl do produto desta PCR foram usados como molde para uma segunda amplificação utilizando os primers B3/B4 em 20 ciclos de 58°C de temperatura de anelamento. Ciclos de anelamento foram adicionados numa temperatura de 54°C por 1 minuto, e uma extensão de 72°C por 2 minutos. Os primers estão descritos na tabela 3. Para se evitar uma possível contaminação na PCR, todas as reações foram feitas utilizando-se uma mistura comum de todos os reagentes, sem o DNA e incluindo uma reação (controle negativo) com água como molde. Foi incluída a amplificação do gene da *beta-globina* como controle positivo, para se verificar a qualidade das amostras. Amostras-controle positivas para HHV-1 e HHV-6 foram obtidas de pacientes com infecção clínica ativa e testes sorológicos positivos (teste de anticorpo fluorescente-FAT e imunoenensaio enzimático-ELISA), controles negativos obtidos de pacientes com nenhum histórico de infecção por HHV e testes sorológicos negativos foram também incluídos em todas as reações de PCR.

**Tabela 3-** Sequências dos primers usados nas reações de PCR para HHV-1, HHV-6 e beta-globina.

PRIMER	SEQUÊNCIAS	FRAGMENTO (bp)
<b>HHV-1</b>	5'-TGCTCCTACAACAAGTCTCTGGG-3' 5'-CGGTGCTCCAGGATAAACTGTG-3'	199
<b>A1/A2</b>	A1 5'-GCGTTTTTCAGTGTGTAGTTCGGCAG-3' A2 5'-TGGCCGCATTCGTACAGATACGGAGG-3'	258
<b>A3/A4</b>	A3 5'-GCTAGAACGTATTTGCTGCAGAACG-3' A4 5'-ATCCGAAACAACGTCTGACTGGCA-3'	
<b>B1/B2</b>	B1 5'-GTGGATCCGACGTCCTACAAACAC-3' B2 5'-CGGTGTCACACAGCATGAACTCTC-3'	658
<b>B3/B4</b>	B3 5'-GGAGAATCTTGTAAGTATATGGTC-3' B4 5'-CTCGGACTCATAGATCTCATACTG-3'	
<b>BETA- GLOBINA</b>	5'-ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3' 5'-GTATTTTCCCAAGTTTGAAC T GACTC-3'	630

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corados com brometo de etídio e foram contados quanto a presença ou ausência do fragmento de 199 bp (HHV-1), 258 bp (para o gene da proteína do capsídeo de HHV-6) e 658 bp (para o gene da proteína do tegumento do HHV-6) (figura 8).

Os produtos das PCR de seis amostras positivas para HHV-6 e outras seis amostras positivas para HHV-1 foram seqüenciadas utilizando o kit de seqüenciamento ABI Prism Big Dye (Perkin-Elmer, Warrington, Cheshire, UK) e o seqüenciador ABI 377 Prism DNA Sequencer (Perkin-Elmer). Todos os produtos foram confirmados pertencerem as seqüências dos correspondentes vírus (Leite et al., 2005).



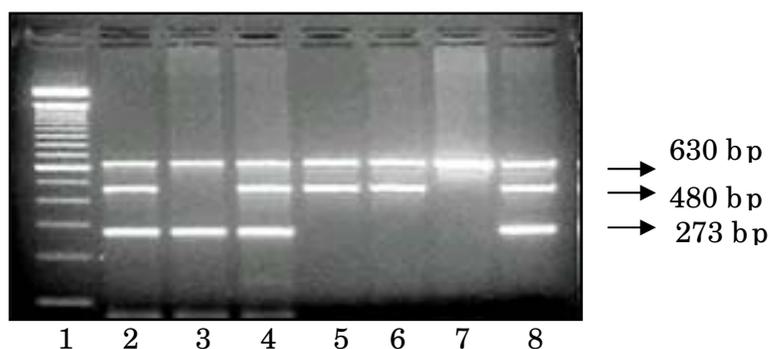
**Figura 8-** Gel de agarose para a detecção dos fragmentos de HHV-6 e HHV-1. O gel ilustrado no painel **a** mostra a PCR usada para a detecção HHV-1. As bandas de 199 bp correspondem ao HHV-1 e as bandas de 630 bp correspondem ao fragmento do gene da beta-globina que foi usado como controle positivo para a amplificação. Nos painéis **b** e **c**, foram ilustrados os resultados da nested PCR usada para a detecção do HHV-6. As bandas de 658 bp correspondem ao produto do tegumento viral de HHV-6 e as bandas de 258 bp as seqüências do capsídio viral, respectivamente. As primeiras colunas foram carregadas com um marcador de peso molecular de 100 bp. As colunas 2-4 foram carregadas com DNA extraído de amostras BCC e as colunas 5-7 com DNA extraído de amostras SCC. A coluna 8 no painel **a** é um controle negativo da reação.

## Estudo dos polimorfismos do sistema GST

Para a análise dos polimorfismos das GSTs foram estudados 102 pacientes adultos, avaliados quanto ao tipo de lesão da pele. O estudo populacional foi composto de 29 SCC, 59 BCC, 5 MM e 9 lesões benignas. Todos os pacientes foram cuidadosamente examinados e suas condições médicas foram consideradas, especialmente quanto à ocorrência de transplantes de órgãos, uso de terapias imunossupressoras, outras malignidades e infecção por HIV.

Um grupo-controle de 124 indivíduos doadores saudáveis (61 homens e 63 mulheres, 36 a 96 anos,  $64.12 \pm 19.34$  anos) foi selecionado da população da nossa região, através do HC/FCM/UNICAMP. Dados de exposição à UV e possível exposição química, etnia, assim como idade e sexo foram considerados a fim de se obter um grupo-controle similar ao de pacientes. Todos os indivíduos viviam em áreas urbanas. Indivíduos suspeitos de alguma condição imunossupressiva ou que tivessem sido expostos a algum agente químico eram excluídos.

O sangue periférico foi obtido de todos os pacientes e indivíduos-controles, simultaneamente com as amostras de tecidos dos pacientes com lesões cutâneas. O DNA genômico foi extraído das amostras congeladas e dos leucócitos separados do sangue total através do protocolo padrão proteinase-K-fenol-clorofórmio. A reação de PCR multiplex foi usada para, simultaneamente, amplificar os genes *GSTT1* e *GSTM1*. O gene da *beta-globina* foi incluído, para todas as amostras, como controle positivo interno. A PCR foi feita para um volume final de 50  $\mu$ l, contendo 100 ng de DNA, 10  $\mu$ M de cada primer, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM de cada dinucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,0 U de Taq DNA polymerase. A amplificação foi feita em 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos e extensão final de 72°C por 7 minutos utilizando o termociclador MJPTC-200 PCR System (tabela 4). Os fragmentos de 273 (*GSTM1*), 480 (*GSTT1*) e 630 (*beta-globina*) bp, correspondentes à presença normal dos alelos, foram visualizados por gel de agarose 2%, corados com solução de brometo de etídio (figura 9).



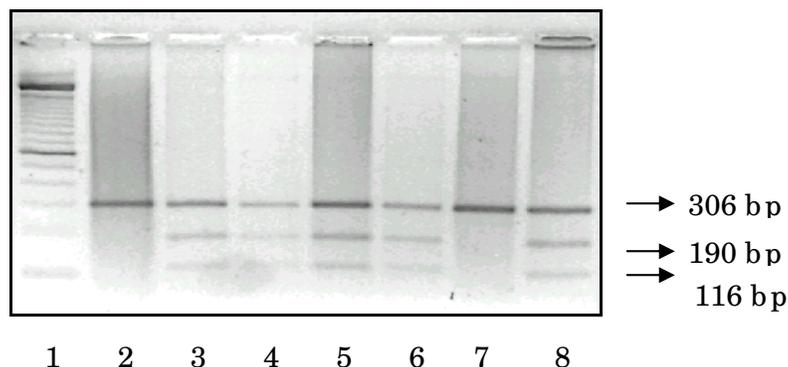
**Figura 9-** Gel de agarose mostrando o resultado da PCR Multiplex, na qual foram utilizados três pares de primers. As bandas de 630 bp correspondem ao gene da *beta-globina*, utilizado como controle, as bandas de 480 bp o gene *GSTT1* e as bandas de 273 bp, o gene *GSTM1*. Nas colunas 2, 4 e 8 visualiza-se a presença dos genes *GSTT1* e *GSTM1*. Já a coluna 3 não possui o gene *GSTT1*, as colunas 5 e 6 não possuem o gene *GSTM1* e o paciente 7 não possui ambos os genes. Pode-se fazer esta afirmação devido à presença do gene *beta-globina* nesta amostra.

As variantes *GSTP1* e *GSTO2* foram estudadas utilizando a técnica de PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). Para *GSTP1*, a PCR foi feita para um volume final de 25 µl contendo 100 ng de DNA, 10 µM de cada primer, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM de cada dinucleotídeo trifosfato, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,5 U de Taq DNA polymerase. A amplificação foi feita em 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, temperatura de anelamento de 62,4°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos e extensão final de 72°C por 7 minutos utilizando o termociclador MJPTC-200 PCR System. O par de primers para *GSTP1* amplificou um fragmento de 306 bp. Para *GSTO2* foram utilizadas as mesmas condições acima, mas com temperatura de anelamento de 62°C. O par de primers para *GSTO2* amplificou um fragmento de 280 bp (tabela 4). A reação de RFLP foi feita utilizando as enzimas Alw26I (*BsmAI*) e *MboI* para *GSTP1* e *GSTO2*, respectivamente, de acordo com protocolo do fabricante (Fermentas Life Sciences). Os fragmentos foram analisados através

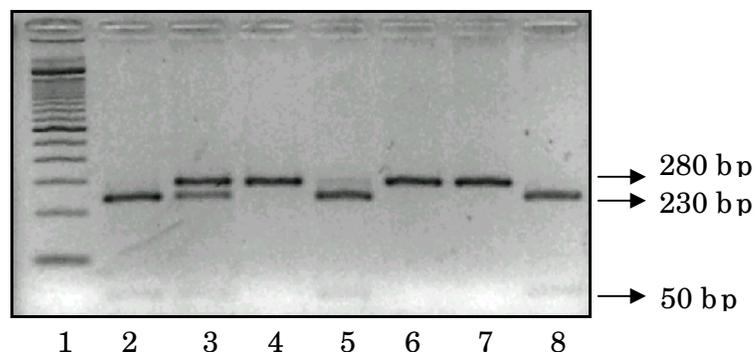
de gel de agarose 3.0% (figuras 10 e 11). Seis amostras de cada reação foram diretamente sequenciadas e confirmadas pertencerem às variantes estudadas. Controles negativos e positivos foram incluídos em todas as reações de PCR e RFLP para se detectar possíveis contaminações, erros de pipetagem ou de corrida de gel (Leite et al., 2007).

**Tabela 4-** Sequência dos primers usados nas reações de PCR multiplex dos polimorfismos das GSTs.

PRIMER	SEQUÊNCIAS	FRAGMENTO (BP)
<i>GSTM1</i>	5'-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3' 5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3'	273
<i>GSTT1</i>	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'	480
<i>GSTP1</i>	5'-CCAGGCTGGGGCTCACAGACAGC-3' 5'-GGTCAGCCCAAGCCACCTGAGG-3'	306
<i>GSTO2</i>	5'-ACTGAGAACCGGAACCACAG-3' 5'-GTACCTCTTCCAGGTTG-3'	280



**Figura 10-** Gel demonstrando os fragmentos resultantes da restrição enzimática para o gene *GSTP1*. Nas colunas 2 e 7, observamos amostras selvagens; nas colunas 3, 4, 5, 6 e 8 amostras heterozigotas para o gene *GSTP1*.



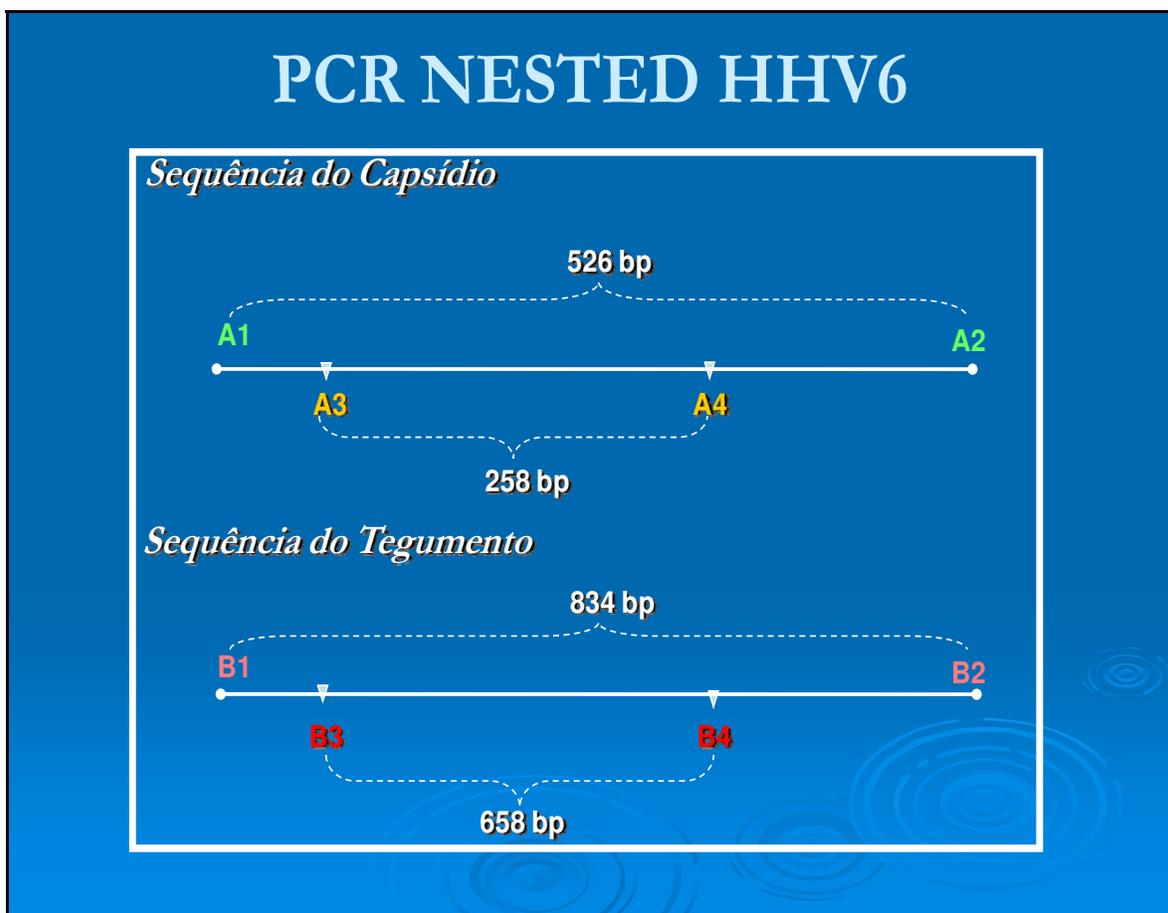
**Figura 11-** Gel demonstrando os fragmentos resultantes da restrição enzimática para o gene *GSTO2*. Nas amostras 2 e 8 as amostras são homozigotas; nas amostras 3 e 5 as amostras são heterozigotas e nas amostras 4, 6 e 7 as amostras são selvagens para o gene *GSTO2*.

#### **Estudo dos polimorfismos do éxon 4 de TP53 em pacientes transplantados renais**

Para o estudo dos polimorfismos dos códons 72 e 47 de *TP53* em pacientes transplantados renais foi estudado um grupo de 78 pacientes que estava fazendo uso de terapia imunossupressiva induzida por Azatioprina, Ciclosporina e Prednisona (55%); mofetil micofenolato, prednisona e ciclosporina (24,2%) e tacrolimus, MMF e prednisona (20,8%). Estes pacientes foram recrutados num período de 06/2003 a 02/2005, e tiveram um seguimento regular no ambulatório de transplante renal da FCM-UNICAMP. Nenhum desses pacientes apresentou complicações anormais ou qualquer malignidade no período de coleta das amostras. Um grupo-controle de 151 indivíduos saudáveis foi selecionado a partir da população da nossa região. Dados de etnia, hábitos alimentares e estilo de vida, assim como idade e sexo foram considerados para se obter um grupo-controle, similar ao grupo dos pacientes.

Amostras de sangue foram obtidas dos 229 indivíduos incluídos neste estudo. Para os pacientes transplantados renais, a coleta foi feita entre 6 e 12 meses depois do transplante. O DNA foi extraído pelo protocolo padrão fenol-clorofórmio.

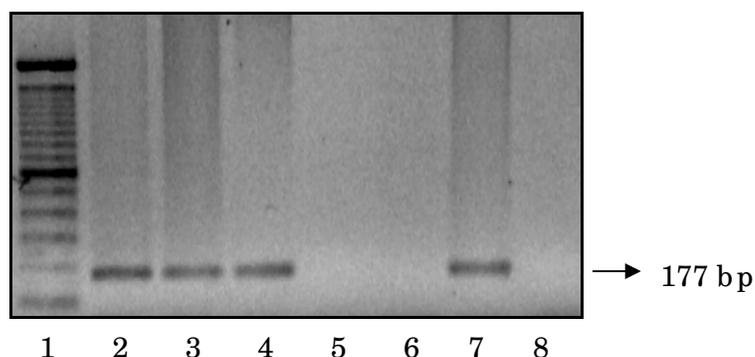
Os HHV-1 e HHV-6 foram identificados utilizando protocolos previamente descritos e esquematizado na figura 9 (Leite et al., 2005).



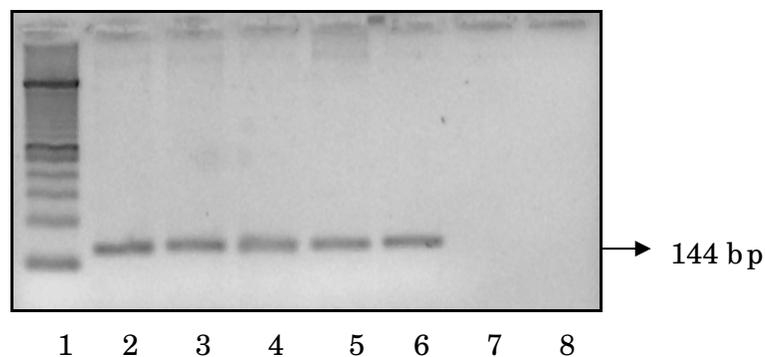
**Figura 12-** Figura ilustrativa da reação de Nested PCR usada no estudo do HHV-6.

Para a genotipagem do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* foi utilizada uma PCR alelo-específica, na qual foram usados dois pares de primers, um para amplificar o alelo selvagem (Arginina) e outro para amplificar o alelo variante (Prolina) (tabela 5). A detecção das duas variantes polimórficas foi feita em dois diferentes ensaios. A PCR foi feita para um volume final de 25µl, contendo: 100 ng de DNA, 10 µM de cada primer, 50 mM de KCL, 10mM de Tris-HCL (pH 8,0), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dinucleotídeo trifosfato e 0,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi feita com 35

ciclos de 94°C por 45 segundos, 68°C para o alelo da arginina e 53°C para o alelo da Prolina, por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos, utilizando o termociclador MJ-PTC 200. Os fragmentos da PCR foram analisados por gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e visualizados em um transiluminador de luz UV (figuras 13 e 14). O produto da PCR para Arginina tinha um tamanho de 141 bp, enquanto que o produto da PCR para Prolina tinha um tamanho de 177 bp. Aqueles indivíduos, cujo genótipo era heterozigoto, possuíam os dois produtos de PCR, enquanto que os homozigotos possuíam apenas um deles. Controles negativos e positivos foram incluídos em todos os ensaios de PCR para se detectar possíveis contaminações. Quatro amostras que apresentaram os três genótipos foram diretamente seqüenciadas, utilizando-se o kit para seqüenciamento ABI Prism Big Dye sequencing (Perkin-Elmer, Warrington, Cheshire, UK) e o seqüenciador ABI 377 Prism DNA (Perkin-Elmer), para se confirmar os presentes genótipos.



**Figura 13-** Gel demonstrando os fragmentos de PCR para o alelo Prolina. Na coluna 1 observamos o marcador de peso molecular. Colunas 2, 3, 4 e 7 observamos amostras que contém o gene que codifica a prolina; nas colunas 5, 6 e 8 observamos amostras negativas para este gene.

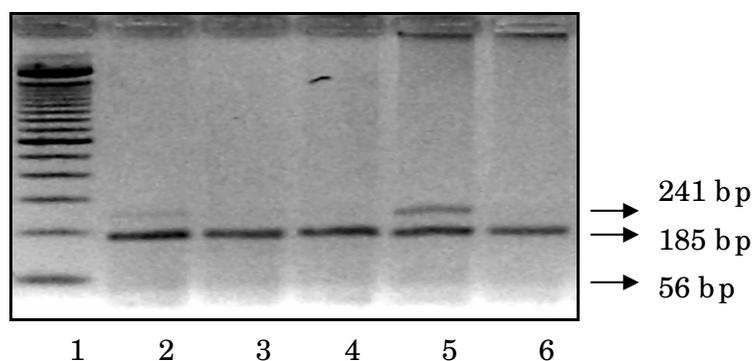


**Figura 14-** Gel demonstrando os fragmentos de PCR para o alelo Arginina. Na coluna 1 observamos o marcador de peso molecular. Nas colunas 2, 3, 4, 5 e 6 observamos amostras que contém o gene que codifica a arginina; nas colunas 7 e 8 observamos amostras negativas para este gene.

Para a genotipagem do polimorfismo do códon 47 do gene *TP53* foi utilizada uma PCR-RFLP com primers que amplificavam um fragmento de 241 bp (tabela 5). A PCR foi feita para um volume final de 25 $\mu$ l, contendo: 100 ng de DNA, 10  $\mu$ M de cada primer, 50 mM de KCL, 10mM de Tris-HCL (pH 8,0), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada dinucleotídeo trifosfato e 0,5 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi feita com 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60,5°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto, com uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos e uma extensão final de 72°C por 10 minutos, utilizando o termociclador MJ-PTC 200. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima BcnI (*CauII*) e analisados em gel de agarose 3% (figura 15). Seis amostras de cada ensaio foram diretamente seqüenciadas e confirmadas pertencerem às variantes deste polimorfismo estudado. Controles negativos e positivos foram incluídos em todos os ensaios de PCR e de RFLP para se detectar possíveis contaminações, defeitos na corrida dos géis ou amplificações inespecíficas (Leite et al., 2006).

**Tabela 5-** Sequência dos primers usados nas reações de PCR alelo-específica de P72 e PCR-RFLP para S47.

PRIMER	SEQUÊNCIAS	FRAGMENTO (bp)
<b>P72 (ARG)</b>	5'-TCCCCCTTGCCGTCCCAA-3'	141
	5'-CTGGCCAGGGGCCACGC-3'	
<b>P72 (PRO)</b>	5'-GCCAGAGGCTGCTCCCCC-3'	177
	5'-CGTGCAAGTCACAGACTT-3'	
<b>S47</b>	5'-CACCCATCTACAGTCCCCC-3'	241
	5'-ACCGTAGCTGCCCTGGTAG-3'	



**Figura 15-** Gel de agarose demonstrando os fragmentos de RFLP para o polimorfismo do códon 47 do gene *TP53*. Na coluna 1 temos o marcador de peso molecular. Nas colunas 2 e 5 temos amostras heterozigotas para o polimorfismo e nas colunas 3, 4 e 6 temos amostras normais (selvagens) para o polimorfismo.

## **Estudo do polimorfismo do códon 72 do gene TP53 em pacientes com Doença de Basedow-Graves**

Para o estudo do polimorfismo do códon 72 de *TP53* em portadores da Doença de Basedow-Graves foram estudados 127 pacientes, diagnosticados através da realização de testes como o TRAb, dosagem de TSH e T<sub>4</sub> livre, entre outros, coletados no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital e Maternidade Celso Pierro de Campinas, que foram comparados com 150 indivíduos-controle, pareados por sexo, idade, características étnicas e exposição ambiental. Para a detecção do HHV-1 e HHV-6 seguimos o protocolo previamente descrito (Leite et al., 2005). Os polimorfismos do códon 72 de *TP53* foram analisados seguindo o protocolo também já descrito (Leite et al., 2006).

### **Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas utilizando o SAS (Sistema de análise estatística, versão 8.1, Instituto SAS Incorporate, Cary, NC, USA, 1999-2000). Associações foram feitas usando análises por tabelas de contingência 2 X 2 ou 2 X n e Chi-quadrado ( $X^2$ ) ou Teste Exato de Fisher (F) para examinar a homogeneidade entre os grupos quanto ao sexo, etnia, posição da lesão da pele, infecção viral e genótipos dos polimorfismos. O Teste de Kruskal-Wallis (KW) foi usado para comparar idade entre os diferentes grupos; número de lesões da pele. O Teste Odds Ratio (OD) ou Razão das Chances e Intervalo de Confiança (IC) 95% compreendem a média da associação, por exemplo, indicando o aumento da diferença dada entre pacientes infectados que apresentam câncer de pele, genótipos dos pacientes que apresentavam infecção, análise da frequência dos fenótipos através da média do poder de associação, comparados com a população-controle. Todos os testes foram conduzidos com  $P < 0.05$  como nível de significância.

## ***RESULTADOS***

## PARTE I- HHV E O CÂNCER DE PELE

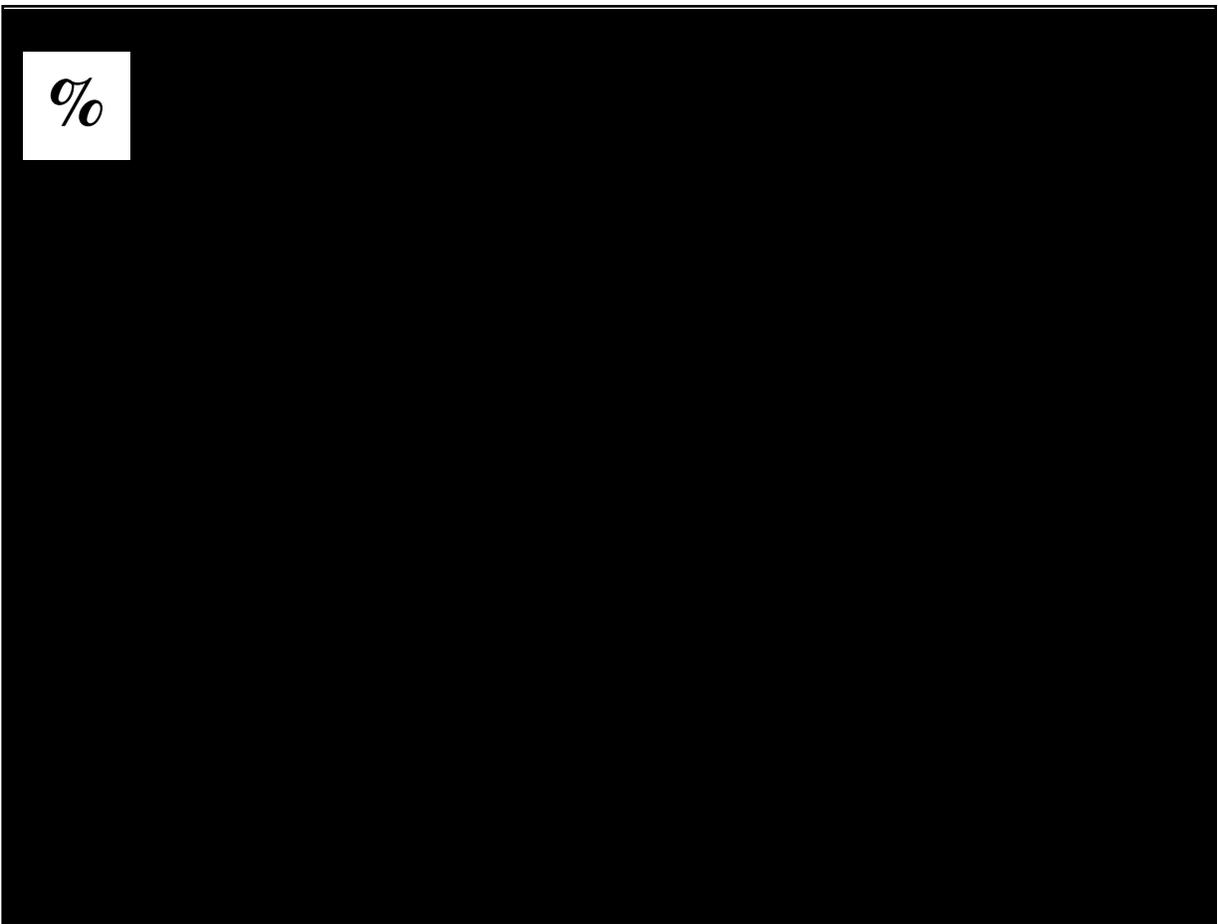
As características clínicas dos diferentes grupos de pacientes e controles utilizados para estudo dos HHV em lesões de pele são apresentadas na tabela 6.

**Tabela 6-** Características clínicas incluindo idade ( $X \pm SD$ ) e intervalo entre os anos, sexo (M, mulheres; H, homens) e etnia (B, brancos; NB, não-brancos) nos indivíduos do grupo-controle, pacientes com lesões benignas da pele, carcinomas de células basais (BCC), carcinomas de células escamosas (SCC) e melanomas malignos (MM).

HISTOPATOLOGIA	IDADE ( $X \pm SD$ )	IDADE	SEXO		ETNIA	
			H	M	B	NB
CONTROLES	46,7 $\pm$ 5,3	21 - 52	19	22	39	2
BENIGNOS	61,38 $\pm$ 16,06	21 - 86	11	8	19	0
BCC	65,88 $\pm$ 11,62	45 - 90	26	25	49	2
SCC	59,82 $\pm$ 19,45	11 - 92	24	17	41	0
MM	74,33 $\pm$ 11,30	51 - 88	3	6	8	1

Embora os pacientes com câncer de pele tendem a ser mais velhos que os controles, todos os grupos foram estatisticamente similares considerando sexo, etnia e idade.

O gráfico (Figura 16) apresenta a comparação da incidência de HHV-1 e HHV-6 nos grupos.



**Figura 16-** Prevalência de HHV-1 e HHV-6 em lesões de pele. A incidência de HHV-1 (barras rosas) e HHV-6 (barras azúis) apresentadas como porcentagem de amostras de indivíduos infectados de 41 indivíduos da população-controle, 19 lesões de pele benignas, 41 carcinomas de células escamosas (SCC), 51 carcinomas de células basais (BCC) e 9 pacientes com melanomas malignos (MM).

Embora as seqüências de DNA do HHV-6 tenham sido detectadas em 30% dos pacientes com lesões cutâneas (36/120) e em somente 14,6% dos tecidos de pele da população-controle (6/41), a diferença não foi estatisticamente significativa (F;  $p=0,06$ ). No entanto, a incidência de indivíduos positivos para HHV-6 foi mais alta em casos de lesões cutâneas malignas de pele (32/101= 31,7%) do que nos indivíduos-controles (F;  $p=0,0391$ ). Por outro lado, indivíduos positivos para HHV-1 foram mais freqüentes em ambos, isto é, tanto no grupo de lesões de pele em geral (28/120=23,33%) como em pacientes com tumores malignos (24/101=23,8%), em relação à população controle (2/41=5%) (F;  $p=0,0094$  para lesões de pele e  $p=0,0078$  para os tumores malignos de pele).

A incidência de HHV-6 foi significativamente maior em portadores de BCC (18/51=35,3%) do que nos tecidos-controle (17,1%) (F;  $p=0,0320$ ). Embora 4 de 9 casos de MM fossem infectados por HHV-6, não houve diferença estatística entre a incidência de HHV-6 em MM e grupo-controle (F;  $p=0,0652$ ). A incidência de HHV-1 foi significativamente maior em ambos os grupos de BCC (15/51=29,4%) e SCC (10/41=24,4%), (F;  $p=0,0027$  e  $p=0,0255$ ), respectivamente. Nenhum caso de infecção por HHV-1 foi detectado em amostras de MM.

O risco de apresentar BCC foi aumentado em mais de três vezes para pacientes infectados por HHV-6 do que para indivíduos não infectados (OR=3,182; 95% IC:1,125-8,997). O risco total para indivíduos com câncer de pele infectados por HHV-1 foi aumentado em mais de seis vezes (OR=6,078; 95% IC:1,365-27,061). Indivíduos infectados por HHV-1 tiveram um risco de apresentar BCC ou SCC aumentado em cerca de oito vezes (OR=8,125; 95% IC:1,735-38,043) e de seis vezes (OR= 6,290; 95% IC:1,283-30,850) comparados com os indivíduos não infectados, respectivamente.

Não houve diferença entre condições de pele malignas e não-malignas quanto à detecção do DNA de HHV-6 ou HHV-1.

O HHV-6 e HHV-1 estavam presentes em amostras autólogas normais de pele, mas não no correspondente tumor de 11/101 (10,9%) e 6/101 (6%) casos de lesões de pele, respectivamente. Esta incidência não foi diferente da incidência de HHV-6 e HHV-1 encontradas nas amostras de pele normais.

Dentre os 25 pacientes com câncer de pele que foram considerados imunossuprimidos, 5 pacientes (20%) tinham HHV-6 e outros 4 (16%) apresentaram fragmentos detectáveis de HHV-1. Esta incidência não é estatisticamente diferente daquelas encontradas em pacientes imunocompetentes e na população-controle. Em 2 dos pacientes imunocomprometidos, o HHV-6 estava presente em ambos, tumor e tecidos autólogos e em outros 3 casos este vírus não foi detectado somente na amostra de tumor. O HHV-1 foi detectado somente no tecido tumoral em 1 caso e em ambos, tumor e tecidos autólogos (normal), em outros 3 pacientes.

## PARTE II - CÂNCER DE PELE E O SISTEMA GST

Para o estudo dos polimorfismos das GSTs em pacientes com câncer de pele as características clínicas dos indivíduos-controle e dos pacientes com lesões de pele estão resumidos na tabela 7, onde também é apresentado o perfil genotípico total dos grupos estudados. Não houve diferença entre os controles e os pacientes com lesões de pele considerando sexo (61 homens e 63 mulheres *versus* 53 homens e 49 mulheres), idade ( $64,12 \pm 19,34$  anos *versus*  $64,11 \pm 15,64$ ) e etnia (98 brancos e 26 não-brancos *versus* 100 brancos e 2 não-brancos) (F;  $p < 0,0001$ ).

A genotipagem dos diferentes tipos de câncer está representada nas tabelas 7 e 8. O genótipo combinado *GSTT1+GSTM1*- foi mais freqüente nos pacientes com BCC (49,1%) do que no grupo controle (29,8%) (F;  $p=0,04$ ). Conseqüentemente, este genótipo conferiu um maior risco, de 2,273 (OR=2,273 95% IC=1,199-4,308), para BCC se comparado às outras combinações de genótipos *GSTM1* e *GSTT1*. *GSTP1* não foi diferente nos controles e pacientes com lesões benignas ou tumores não-melanoma. Entretanto, três de cinco pacientes com MM apresentaram a variante homozigótica de *GSTP1*, em contraste com a baixa prevalência desta variante na população-controle (14,5%) (F;  $p=0,0303$ ). A presença da variante homozigótica do gene *GSTP1* conferiu uma suscetibilidade aumentada em 8,8 vezes para MM (OR=8,883; 95% IC= 1,378-56,636).

**Tabela 7-** Distribuição dos indivíduos-controle e dos pacientes. Esta distribuição está de acordo com a histologia das lesões de pele, características clínicas incluindo idade ( $X \pm SD$  em anos), sexo (M, mulheres; H, homens) e etnia (B, brancos; NB, não-brancos) e os correspondentes genótipos para *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *GSTO2*. Os genótipos estão representados como + (presentes) ou – (ausentes) de acordo com a presença do alelo ou WT, HET e HO de acordo com a presença da forma variante selvagem, heterozigoto ou homozigoto do gene, respectivamente.

HISTOPATOLOGIA	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS						GENÓTIPO								
	Idade ( $X \pm SD$ )	Sexo		Etnia		<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>		<i>GSTP1</i>			<i>GSTO2</i>		
		H	M	B	NB	+	-	+	-	WT	HET	HO	WT	HET	HO
Controles (N= 124)	64,12±19,34	61	63	98	26	72	52	96	28	60	46	18	40	62	22
Não-malígnos (N= 9)	61,66±20,44	3	6	9	0	5	4	7	2	7	1	1	3	5	1
BCC (N= 59)	67,42±11,18	33	26	58	1	25	34	49	10	35	20	4	25	26	8
SCC (N= 29)	56,16±19,23	16	13	29	0	28	13	22	7	14	13	2	12	12	5
MM (N= 5)	75,8 ± 6,94	1	4	4	1	4	1	2	3	1	1	3	2	2	1

**Tabela 8-** Comparação da distribuição das diferentes combinações dos genótipos *GSTT1* e *GSTMI* na população-controle e nos casos de pele benignos e malignos, incluindo o BCC, SCC e MM.

GENÓTIPO	CONTROLES		BENIGNOS		BCC		SCC		MM	
<i>GSTT1-GSTMI-</i>	15	(12.09)	1	(11.11)	5	(8.47)	2	(6.89)	1	(20.00)
<i>GSTT1-GSTMI+</i>	13	(10.48)	1	(11.11)	5	(8.47)	5	(17.24)	2	(40.00)
<i>GSTT1+GSTM-</i>	37	(29.83)	3	(33.33)	29	(49.15)	11	(37.93)	0	
<i>GSTT1+GSTMI+</i>	59	(47.58)	4	(44.44)	20	(33.89)	11	(37.93)	2	(40.00)
<b>TOTAL</b>	<b>124</b>		<b>9</b>		<b>59</b>		<b>29</b>		<b>5</b>	

Não foi encontrada uma diferença significativa entre a proporção dos alelos normais ou variantes de GST nos diferentes tipos de tumores malignos. Não houve associação entre os genótipos ou entre qualquer genótipo e as características clínicas dos pacientes.

### PARTE III- IMUNOSSUPRIMIDOS, O GENE *TP53* E OS HHV

No estudo dos polimorfismos dos códons 72 e 47 de *TP53* em pacientes transplantados renais ambos os grupos de pacientes e controles foram estatisticamente similares quanto a sexo (31 homens e 47 mulheres *versus* 66 homens e 85 mulheres), idade ( $42,76 \pm 12,86$  *versus*  $38,87 \pm 14,85$  anos) e etnia (71 brancos e 7 não-brancos *versus* 132 brancos e 19 não-brancos), características demográficas e estilo de vida, incluindo consumo de álcool, cigarro, dieta alimentar, educação e exercícios, UV e possível exposição química.

A tabela 9 resume os dados de proporções totais dos genótipos dos códons 72 e 47 de *TP53* na população-controle e na população de pacientes transplantados renais. Os genótipos, tanto entre os pacientes como no grupo-controle, não estavam em equilíbrio com a lei de Hardy-Weinberg<sup>2</sup>, em que se diz: "Não existem fatores evolutivos atuando sobre uma população, as frequências gênicas permaneceriam inalteradas e as proporções genotípicas atingiriam um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo." (Hardy, 1908; Weinberg, 1908). Os pacientes transplantados renais

mostraram um aumento na frequência da variante selvagem Arg/Arg do códon 72 de *TP53* (64,1%) em comparação com a população controle (36,4%) (F;  $p < 0,001$ ). A variante selvagem Pro/Pro do códon 47 de *TP53* apareceu em proporções similares na população de transplantados renais (78,2%) e controles (70,19%). O S47 ocorreu em 45 indivíduos brancos e 17 não-brancos. Somente 36 (29,03%) dos 124 indivíduos que apresentaram variantes de P72 também tinham a variante de S47. O número de indivíduos que apresentaram as variantes de P72 e S47 combinadas foi maior no grupo controle (19,86%) do que nos pacientes transplantados renais (7,69%) (F;  $p = 0,0206$ ).

As infecções por HHV-6 e HHV-1 foram detectadas em 28 e 2 pacientes, transplantados renais, respectivamente, como demonstrado na tabela 10. A infecção por HHV-6 foi mais frequente nos pacientes transplantados renais (35,89%) do que na população-controle (11,25%) (F;  $p < 0,0001$ ), mas não houve diferença na incidência de positividade para HHV-6 nos subgrupos de pacientes tratados com diferentes drogas imunossupressoras. Não houve diferença estatística entre a prevalência da infecção por HHV-1 na população-controle (7,28%) e de pacientes transplantados renais (2,56%).

**Tabela 9-** Distribuição dos genótipos dos códons 72 e 47 do éxon 4 de *TP53* nos indivíduos-controle e pacientes transplantados renais.

CÓDON	GENÓTIPOS	CONTROLES		TRANSPLANTADOS RENAIIS		P
		N	(%)	N	(%)	
Códon 72	<i>Arg/Arg</i>	55	(36,42)	50	(64,1)	<b>&lt;0,0001</b>
	<i>Arg/Pro</i>	94	(62,25)	26	(33,33)	<b>&lt;0,0001</b>
	<i>Pro/Pro</i>	2	(1,32)	2	(2,56)	0,2194
Códon 47	<i>Pro/Pro</i>	106	(70,19)	61	(78,2)	0,2130
	<i>Pro/Ser</i>	45	(29,8)	17	(21,79)	0,2130
	<i>Ser/Ser</i>	0		0		
Códon 72 + 47	variantes	30	(19,86)	6	(7,69)	<b>0,0206</b>
<b>Total de casos</b>		<b>151</b>		<b>78</b>		

Não houve diferença no número de pacientes infectados por HHV-6 ou HHV-1 entre os casos de S47 e selvagem do códon 47 de *TP53*. A proporção de infectados por HHV-1 foi similar nos indivíduos com genótipo P72 variante e genótipo selvagem do códon 72 de *TP53*. Entretanto, casos positivos para HHV-6 foram mais frequentes nos pacientes transplantados renais com variantes de P72 (17 de 28 casos HHV-6 positivos = 60,71%) do que nos pacientes que apresentaram o genótipo selvagem *Arg/Arg* (11 de 50 casos = 22%) (F; p= 0,001). De fato, a presença de um alelo Pro aumentou o risco para infecção por HHV-6 em mais de 5 vezes (OR = 5,479; 95% IC = 1,992-15,069).

**Tabela 10-** Risco relativo estimado para a infecção por HHV-6 e HHV-1 associadas aos genótipos do éxon 4 de *TP53*.

GENÓTIPOS	CONTROLES		TRANSPLANTADOS		OR	P	OR	P
	HHV-6	HHV-1	HHV-6	HHV-1				
<b>RENAIS</b>								
	HHV-6	HHV-1	HHV-6	HHV-1	(IC)	HHV-6	(IC)	HHV-1
<b>CÓDON 72</b>								
<b>ARG/ARG</b>	5	2	11	2	1 $\Upsilon$	-	1 $\Upsilon$	-
<b>ARG/PRO</b>	12	9	15	0	4,835 (1,732 – 13,494)	<b>0,004</b>	0,366 (0,016 – 7,915)	0,543
<b>PRO/PRO</b>	0	0	2	0	17,174 (0,768 - 384,03)	0,058	3,880 (0,144 – 104,41)	1,000
<b>P72 variantes</b>	12	9	17	0	5,479 (1,992 – 15,069)	<b>0,001</b>	0,340 (0,015 – 7,348)	0,533
<b>CÓDON 47</b>								
<b>PRO/PRO</b>	15	9	22	2	1 $\Upsilon$	-	1 $\Upsilon$	-
<b>PRO/SER</b>	2	2	6	0	0,966 (0,314 – 2,975)	1,000	0,680 (0,031 – 14,848)	1,000
<b>SER/SER</b>	0	0	0	0	-	-	-	-
<b>S47 variantes</b>	2	2	6	0	0,966 (0,314 – 2,975)	1,000	0,680 (0,031 – 14,848)	1,000

#### PARTE IV- HHV, DOENÇA DE BASEDOW-GRAVES E GENE *TP53*

No estudo dos polimorfismos do códon 72 de *TP53* em portadores de DG foi observada uma grande incidência de pacientes positivos para o HHV-6 em relação aos controles. Quando o polimorfismo do códon 72 de *TP53* foi analisado pela técnica de PCR alelo-específica, percebeu-se que houve uma maior frequência do genótipo selvagem em pacientes com DG do que no grupo-controle. Foi visto, ainda, que o genótipo homocigoto variante simplesmente não foi detectado na população de indivíduos-controle, enquanto que nos pacientes com DG apareceu com uma frequência de 11,8% (tabela 11).

Foi observado que a infecção pelo HHV-6 aumentou a suscetibilidade para o desenvolvimento da DG. Os indivíduos infectados pelo vírus têm um risco duas vezes maior (OR= 2,112; 95% IC: 1,092-4,087) de desenvolver a DG do que aqueles não-infectados.

O genótipo homozigoto variante Pro/Pro aumentou o risco para a DG em mais de 28 vezes (OR= 28,395; 95% IC: 1,658 -486,36; p= 0,0692).

Foi observado ainda que há uma tendência para o aumento de risco para desenvolvimento da DG (OR= 3,491; 95% IC: 0,9556 -12,753), quando o indivíduo, além de possuir o alelo alterado Prolina do polimorfismo, possui também a infecção pelo HHV-6, embora estes dados não tenham alcançado significância estatística (P=0.069).

**Tabela 11-** Distribuição dos genótipos do códon 72 de *TP53* na população-controle e de pacientes portadores da DG e valores de significância estatística quando comparado o genótipo selvagem com os genótipos variantes.

GENÓTIPOS CÓDON 72	CONTROLES		BASEDOW-GRAVES		PROBABILIDADE
	N	(%)	N	(%)	
ARG/ARG	54	36	59	46,4	¥
ARG/PRO	96	64	53	41,7	0,0082
PRO/PRO	0	0	15	11,8	0,0002
TOTAL	150		127		

## ***DISCUSSÃO***

## **HHV e o câncer de pele**

Conseguimos detectar fragmentos de DNA de HHV-6 e HHV-1 em DNA extraído de amostras de pele normal obtidas de 14,6 e 5%, respectivamente, de uma população-controle saudável da nossa região (Leite et al., 2005), uma prevalência similar a relatada em outros grupos étnicos, utilizando métodos baseados em PCR (Secchiero et al., 1995). Estas razões indicam infecção ativa e são consistentes com mais razões elevadas obtidas em um levantamento soropidemiológico no Brasil (Rajcani et al., 1994; Carrigan, 1995).

Sabe-se que o contato direto de sangue infectado com HHV-6 e células epidérmicas pode estabelecer uma infecção viral na pele. A infecção por HHV-6 pode então causar, nas células epidérmicas, o aumento da expressão de muitas moléculas de superfície, incluindo a ICAM-1, causando o aumento da inflamação de células migratórias no desenvolvimento da lesão. As mudanças biológicas induzidas pela reativação de HHV-6 podem ter um papel importante na promoção e fluxo de células inflamatórias nas lesões da pele (Yoshikawa et al., 2004).

Estudos soropidemiológicos mostram que a infecção por HHV-6 é muito comum em humanos e é distribuída geograficamente. A frequência da soropositividade de HHV-6 varia de acordo com o país, a população estudada e os ensaios sorológicos utilizados no estudo. A soropositividade em recém-nascidos corresponde ao anticorpo materno e, com seis meses de idade a síntese de seus próprios anticorpos segue inicialmente a infecção primária. O título de anticorpos diminui com seis meses de vida, refletindo a perda progressiva do anticorpo materno e, muito mais tarde, no fim da vida, evidenciando um possível decaimento da resposta imune (Brown et al., 1988; Yanagi et al., 1990).

A prevalência para o HHV-6 sugere que 97% das crianças nos Estados Unidos tenham sido infectadas com HHV-6B (Campadelli-Fiume et al., 1999; Clark, 2003; Krueger e Ablashi, 2003). Um estudo de prevalência de HHV-6A e HHV-6B na África, entretanto, mostrou que apenas 44% das crianças foram infectadas com HHV-6A (Kasolo et al., 1997). Como nos infectados por HHV-6B, as crianças exibiram febre, rash ou outros sintomas geralmente observados na infecção por HHV-6

(Yamanishi et al., 1988). A maioria dos estudos em crianças, no Japão, revela que a infecção por HHV-6B é mais prevalente. É evidente que há uma diferença geográfica na distribuição de HHV-6A e HHV-6B, em algumas áreas do mundo. No Japão há ausência de infecção por HHV-6A, enquanto que, na África, as variantes A e B são distribuídas proximamente da mesma forma.

A alta soroprevalência da infecção na população é um obstáculo básico para se interpretar algum resultado soropositivo em termos de doença ou infecção aguda. A presença de IgM e o aumento significativo no título de anticorpos podem estar ausente enquanto a infecção por HHV-6 está ativa. Nenhum teste sorológico é capaz de discriminar anticorpos para as variantes A e B de HHV-6 (Fillet et al., 1995; Cone et al., 1996). Neste contexto, é difícil considerar um diagnóstico diferencial da infecção das variantes de HHV-6 baseada na sorologia, considerando que ambos os anticorpos específicos das variantes estão presentes juntos, na maioria dos casos, e provavelmente há reação-cruzada com outros vírus, particularmente com dois outros betaherpesvírus humanos, HCMV e HHV-7. Isto inclui dois fenômenos distintos: a produção de anticorpos reagindo em comum com epítomos de dois ou três vírus diferentes e a produção heterotípica de anticorpos para um dado vírus quando a infecção por outro ocorre. O aumento de anticorpo para HHV-6 em pacientes com infecção primária por HCMV tem sido bastante estudado (Irving et al., 1988; Chou e Scott, 1990; Ward et al., 1991). Alguns casos de soroconversão para HHV-7 têm sido associados com aumento simultâneo no título de anticorpo e, experimentalmente, alguns soros polivalentes elevados para HHV-7 mostram uma reatividade cruzada para HHV-6 (Foa-Tomasi et al., 1994).

Dados obtidos em adultos mostram que em 60% dos homens (com média de idade de 68 anos) estudados para a reativação de HHV-6, a razão foi maior nos pacientes doentes do que nos voluntários saudáveis (54/101 vs. 0/50,  $p=0.001$ ) (Razonable et al., 2002).

Em um grupo de 277 crianças que foram acompanhadas desde seus primeiros dois anos, a infecção primária foi detectada em 130 crianças (40%) utilizando o DNA de HHV-6 na saliva como parâmetro na detecção da infecção primária. Quarenta por cento

dessas crianças tinham o teste de saliva positivo para HHV-6 em 12 meses e 77% por 24 meses de idade (Zerr et al., 2005b).

Vários estudos examinaram a presença de DNA de HHV-6A em sangue periférico e secreções em indivíduos normais e sugerem que a infecção com HHV-6A parece ser muito menos freqüente do que com HHV-6B (Aberle et al., 1996; Tanaka-Taya et al., 1996; Hall et al., 1998; Caserta et al., 2004; Ward 2005).

A observação da figura 16 confirma uma taxa de incidência de HHV-1 crescente de lesões benignas para casos de SCC e BCC, com ausência notável de casos de HHV-1 em MM. Também, a incidência de HHV-6 foi maior em BCC (18/120, 15%). De fato, encontramos um aumento triplicado para o risco de BCC em pacientes infectados por HHV-6. A presença da infecção por HHV-1 aumentou a suscetibilidade para BCC em oito vezes e em seis vezes para SCC (Leite et al., 2005). Estes resultados diferem de Zafiropoulos e colaboradores que não encontraram algum fragmento de HHV-1 em amostras de câncer MM obtidas de pacientes gregos (Zafiropoulos et al., 2003).

Não conseguimos demonstrar alguma significância diferente entre condições de pele patológicas malignas e não-malignas para a detecção de DNA de HHV-1 e HHV-6. Também, demonstramos a presença de ambos, HHV-6 e HHV-1 em tecidos autólogos normais e de pacientes com lesões de pele e em pele normal-controle, sugerindo que a pele pode ser um reservatório para infecções persistentes em adultos (Leite et al., 2005).

O HHV-6 mostrou infectar, *in vitro*, células do endotélio humano de diferentes espécies sem produzir efeitos citopatológicos, sugerindo que as células do endotélio podem funcionar como outro reservoir para HHV-6, *in vivo* (Caruso et al., 2002).

Astrócitos fetais humanos também podem ser infectados por ambas as variantes de HHV-6, podendo reinfetar células T primárias e astrócitos (He et al., 1996). Outras linhagens celulares também podem ser infectadas por HHV-6: células T (Ablashi et al., 1988; Cermelli et al., 1997), epiteliais (Chen et al., 1994), fibroblásticas (Luka et al., 1990), monocíticas (Arena et al., 1997), hematopoiéticas imaturas (Furlini et al., 1996), megacarioblásticas e neuroblásticas (Ablashi et al., 1988), hepatocíticas (Inagi et al., 1996), e astrocitomáticas originais (Yoshikawa et al., 2002).

Os dados obtidos no estudo dos HHV sugerem que sua prevalência seja maior em pacientes imunossuprimidos. Na verdade, o HHV-6 é talvez o melhor exemplo de infecção viral oportunista que pode reativar em condições de estresse ou imunossupressão. O HHV-6 pode reativar em casos de desregulação ou deficiência imune. Reativação seletiva de HHV-6 foi demonstrada criticamente em pacientes imunocompetentes (Desachy et al., 2001; Razonable et al., 2002). Isto o tornou reconhecido como um patógeno emergente em receptores de transplantes (Descamps et al., 2003).

O HHV-1 também é reconhecidamente capaz de persistir na forma latente por toda a vida do hospedeiro, periodicamente se reativando. Entretanto, um potencial oncogênico definitivo ainda não foi documentado. Em animais e em estudos *in vitro* em cultura de tecidos, o HHV-1 pode participar na transformação maligna, cromossomal aberração/mutação e amplificação de genes na presença de luz UV e carcinógenos, como as nitrosaminas e outros extratos do tabaco (Lusso et al., 1994; Inoue et al., 1997; Dockrell, 2003). O HHV-1 liga e inativa o fator de crescimento de fibroblastos básicos. É a ligação deste fator que pode ativar certos oncogenes (Scully, 1993; Lusso et al., 1994; Dockrell, 2003). A presença dos produtos do gene HHV-1 em carcinomas orais tem sido documentada; portanto, isto pode simplificar a representada reativação da infecção por HHV-1, devido a supressão da atividade das células natural killers, os quais geralmente mantém a infecção por HHV-1 verificada e na fase latente (Lusso et al., 1994; Inoue et al., 1997; Dockrell, 2003). Há também evidências que o HHV-1 participa como um cofator no desenvolvimento de SCC (Lusso et al., 1994).

A infecção pelo HHV-1 tem-se tornado cada vez mais precoce na população de classe média européia e norte-americana, estando presente na forma latente em indivíduos cada vez mais jovens. A incidência de casos novos do HHV-1 é estimada em aproximadamente 1,5% por ano até a idade de 50 anos. O aumento na incidência da infecção herpética genital pelo HHV-1 é, também, uma tendência mundial. Portadores de herpes simples genital na região amazônica tiveram o HHV-1 como agente causal de 28,5% das ulcerações genitais (Lupi et al., 1996). Especula-se que fatores socioepidemiológicos próprios da transmissão do HHV-2 tornem-se importantes para o HHV-1 (Sokol e Garry, 1997).

Demonstramos uma considerável prevalência da infecção por HHV-6 e HHV-1 em tecidos com câncer de pele que pode ser, em parte, relacionado à elevada idade dos pacientes deste grupo (Leite et al., 2005), já que a prevalência dos títulos de anticorpos contra HHV-6 e HHV-1 é reconhecidamente maior na população mais idosa (Griffiths, 1996).

### **Câncer de pele e o sistema GST**

O perfil genético de cada população, padrão ocupacional, características alimentares e sociais, são fundamentais na determinação da suscetibilidade a alguns tumores. Além disso, um balanço entre muitas enzimas detoxificantes pode ser mais importante que a atividade de uma única enzima para uma capacidade protetora contra danos mediados por radicais livres e deficiências de um gene pode ser, parcialmente, compensada por outros genes relatados, dando ênfase à importância de determinar perfis genéticos de populações específicas. A população brasileira é, particularmente, interessante, devido à alta heterogeneidade e mistura racial. Dados na influência dessas suscetibilidades genéticas para o câncer de pele ainda são escassos (Leite et al., 2007).

As GSTs são um importante grupo de enzimas antioxidantes que podem ter um envolvimento na proteção de células contra metabólitos oxigênio-reativos. Nosso laboratório tem estudado extensivamente a influência dos polimorfismos germinativos nos genes codificantes destas enzimas em tumores de diferentes tipos (Morari et al., 2002, 2006; Granja et al., 2004a, 2005). O presente estudo demonstra que o genótipo combinado *GSTT1+GSTM1-* predispõe ao desenvolvimento de BCC. Além disso, a presença da variante de *GSTP1* em homozigose pode aumentar o risco para MM, embora o pequeno número de casos estudados impeça qualquer conclusão adicional (Leite et al., 2007). Por outro lado, o perfil genotípico encontrado nos pacientes com lesões de pele resultou similar ao perfil genético descrito anteriormente pelo nosso próprio grupo e também outros estudos de diferentes tipos de tumores no Brasil (Morari et al., 2002; Rossini et al., 2002; Nascimento et al., 2003; Granja et al., 2004a; Gattás et al., 2004; Granja et al., 2005). Como estes genótipos poderiam interferir na suscetibilidade ao câncer de pele? O genótipo *GSTM1* nulo tem sido associado a um risco de carcinoma não-melanoma, especialmente em homens com múltiplos BCC e pacientes imunossuprimidos (Carless et al., 2002;

Kerb et al., 2002; Fryer et al., 2005). Além disso, em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, o *GSTMI* nulo foi associado com o aumento da produção de anticorpos anti-Ro, um fenótipo associado com marcadores de fotosensibilidade (Heagerty et al., 1996). Nossos dados sugerem um efeito protetor do genótipo *GSTT1* nulo quando combinado com o genótipo *GSTMI* nulo (Leite et al., 2007). Vários estudos recentes *in vitro*, na maioria realizados com metabólitos do butadieno, confirmam uma ação protetora de *GSTT1* (Ollier et al., 1996).

Vários estudos mostram que indivíduos que são deletados em homozigose para *GSTMI* e *GSTT1*, assim como indivíduos que apresentam as variantes de *GSTP1* (GSTv), resultando de substituições no aminoácido (1105Valina) no éxon 5 de *GSTP1*, possuem fatores de risco aumentados para uma série de tumores, incluindo os da tireóide (Clapper, 2000; Morari et al., 2002; Vineis, 2003; Granja et al., 2004).

Há evidências para um papel do *GSTP1* na patogênese de malignidades da pele. O *GSTP1* é o mais importante antioxidante em epiderme e derme, e é superexpresso numa variedade de tecidos neoplásicos e pré-neoplásicos (Landi, 2000). Entretanto, dados aqui apresentados não sustentam um importante papel de *GSTP1* no câncer de pele não-melanoma e o pequeno número de MM estudados impedem alguma conclusão a respeito desse tipo de tumor (Leite et al., 2007).

Incluimos o polimorfismo do *GSTO2* neste estudo por causa das variantes GSTO com menor capacidade em biotransformar arsênico inorgânico (Whitbread et al., 2003; Tanaka-Kagawa et al., 2003). O arsênico é um conhecido carcinógeno ambiental da pele e a contaminação das águas com arsênico inorgânico vem sendo apontado como um problema de saúde mundial (Landi, 2000). Entretanto, nossos dados não indicam um papel importante de *GSTO2* na carcinogênese do câncer de pele (Leite et al., 2007).

É importante notar que a influência de alguns polimorfismos genéticos únicos pode ter uma pequena contribuição na suscetibilidade de malignidade cutânea que é influenciada por uma multidão de genes que podem proteger contra um ao outro ou aumentar a suscetibilidade para um aumento na lista de carcinógenos químicos, físicos e

biológicos. Também, as diferentes enzimas GST têm específicos substratos endógenos e ambientais, um fato que ajuda a explicar a diferença na proporção de muitos tumores descritos em diferentes populações (Leite et al., 2007).

### **Imunossuprimidos, o gene *TP53* E OS HHV**

Reativações detectáveis de HHV-6 ocorrem em 1/3 ou 2/3 de todos os transplantes (Smith et al., 2001). Encontramos 35,89% dos nossos pacientes transplantados renais infectados com HHV-6 (Leite et al., 2006), uma proporção muito similar à maioria dos relatos na incidência de infecções por HHV-6 em transplantados de órgãos sólidos (Ketteler et al., 2003).

O gene *TP53* tem um papel no controle do ciclo celular, facilitando as atividades de reparo do DNA e protegendo contra os danos no DNA (Robles e Harris, 2001). Todos os agentes infecciosos que requerem a replicação de seu próprio genoma no núcleo do hospedeiro têm que superar a barreira apresentada pelo *TP53*. Alterações no nível de expressão, função e localização do *TP53* causadas pelos HHV têm sido relatadas em vários estudos e tem sido sugerido que os HHV requerem um recrutamento de *TP53* a fim de se replicarem (Muralidhar et al., 1996; Flaitz e Hicks, 1998; Takemoto et al., 2004).

Takemoto (2004), através de experimentos *in vitro*, demonstrou que a elevação no nível da proteína p53, envolvendo um ou mais genes das proteínas IE dos HHV, não está restrita a certos tipos celulares, mas ocorre numa variedade de células infectadas por HHV-6, devido a um aumento na estabilidade e síntese de p53. Esta estabilização de p53, induzida pela infecção por HHV-6 acontece devido a uma desubiquitinização (desestabilização), mas este mecanismo ainda não está claro (Takemoto et al., 2004). O HHV-6 emprega alguns mecanismos que retêm p53 dentro do citoplasma, podendo explicar um defeito funcional de p53 em alguns experimentos. Com isto o HHV-6 parece proteger as células infectadas de uma ação apoptótica (Takemoto et al., 2004). Como consequência, células hospedeiras, com infecção latente, viral permanecem em proliferação, sem qualquer regulação, reparo celular ou mecanismos de eliminação. Essas células infectadas podem continuar sofrendo mutações adicionais induzidas por outros eventos danificadores como

tabaco, agentes carcinógenos e outras infecções virais (Scully, 1993; Nevins e Vogt, 1996; Tyler e Fields, 1996; Poeschla e Wong-Staal, 1997; Flaitz e Hicks, 1998).

Existem evidências de que a infecção primária por vírus está associada com a indução de apoptose tanto *in vitro* como *in vivo* (Inoue et al., 1997; Yasukawa et al., 1998). Estudos com linhagens celulares contínuas têm documentado um acúmulo aberrante citoplasmático de supressor tumoral e da proteína antiapoptótica p53 após infecção por HHV-6 (Takemoto et al., 2004; Zhen et al., 2005). A elevação de p53 começa primariamente depois do princípio da infecção, e não ocorre após inoculação de vírus inativados, como se dependesse da expressão de genes das IE (immediate-early) (Takemoto et al., 2004).

A habilidade de *TP53* induzir a apoptose está significativamente reduzida por dois polimorfismos, no códon 47 e 72 do éxon 4 (Li et al., 2005). Estudos mostram que a presença da variante mutante do polimorfismo do códon 72 de *TP53* significa uma perda na sua habilidade em agir no ciclo celular e indução da apoptose, prevenindo a proliferação de células com o DNA danificado (Karp, 2002). Li e colaboradores demonstraram que a variante de S47 de p53 também diminui a habilidade de *TP53* em induzir a apoptose *in vivo* (Li et al., 2005). Encontramos uma alta prevalência da infecção por HHV-6 nos indivíduos com menos alelos efetivos de P72, sugerindo que a infecção por HHV-6 é facilitada pela presença do polimorfismo do códon 72 (Leite et al., 2006). Controlando as células, mais do que as destruindo, o HHV-6 pode ter desenvolvido uma vantagem evolucionária. De fato, escondendo-se do sistema imune e mantendo as células infectadas vivas, o HHV-6 pode impedir a reação imune iniciada pela liberação de proteínas virais das células apoptóticas. Conseqüentemente, a infecção de células que são mais hábeis a resistir aos estímulos para indução da apoptose pode favorecer a sobrevivência de HHV-6 (Takemoto et al., 2001).

Não conseguimos identificar um alto risco de infecção viral nos indivíduos com o polimorfismo do S47, talvez por causa do número relativamente baixo de pacientes com este polimorfismo (Leite et al., 2006). Há muito poucos dados sobre o polimorfismo do S47. Ele foi descrito em menos de 5% de afro-americanos e em nenhum dos 69 caucasianos incluídos num primeiro estudo de prevalência (Felley-Bosco et al., 1993). Mais recentemente, genotipando mais de 200 afro-americanos, Li identificou uma baixa

prevalência da variante S47 - em somente 1% dos indivíduos, e encontrou o alelo S47 em *cis* com o polimorfismo da prolina72 (P72) sugerindo que S47 e P72 estavam ligados (Li et al., 2005). Nossos dados indicam uma prevalência muito maior, de 27,07%, da variante S47 na população brasileira. Além disso, somente 29% dos polimorfismos de S47 ocorreram em *cis* com o polimorfismo do P72 (Leite et al., 2006), contradizendo relatos prévios. Na verdade, nossa população é privilegiada para todos os estudos que envolvem fatores étnicos por nossa população ser composta por pessoas de diferentes heranças, resultado de imigrações relativamente recentes. Além disso, estudamos um número de indivíduos relativamente elevado, de forma que acreditamos que estes fatores tenham contribuído para a perda observada do equilíbrio genotípico de Hardy-Weinberg. O fato de a maioria dos indivíduos com S47 em nossa população ser branca sugere que amplos estudos, incluindo um grande número de caucasianos, são necessários para estabelecer uma real prevalência de S47 (Leite et al., 2006).

### **HHV, doença de Basedow-Graves e gene *TP53***

Na maioria dos estudos recentes de relatos de casos de doenças auto-imunes, a associação com vírus foi mostrada pertencer à família dos HHV, particularmente o HHV-6 (Hayashibara et al., 1993). A reativação de HHV-6 foi determinada por um significativo aumento no nível de anticorpos IgG específicos no soro durante seu curso clínico, o aumento no número de cópias de DNA de HHV-6, no sangue periférico durante o estágio ativo da doença e a diminuição mais tarde foi demonstrado por real-time PCR quantitativo (Aihara et al., 2003).

O HTLV-1 é considerado estar implicado na patogênese das doenças auto-imunes no Japão, onde este retrovírus é endêmico e estudos epidemiológicos mostram uma associação entre a infecção por HTLV-1 e doenças da tireóide no Japão (Kawai et al., 1992; Mizokami et al., 1994; Akamine et al., 1996).

Estudos mostram que o HTLV-1 circulante tem uma alta carga em pacientes soropositivos com Tireoidite de Hashimoto (HT) ou DG do que HTLV-1 assintomático; o HTLV-1 pode ser transmitido em células tireoidianas de HTLV-1 produzidas por linhagens de células T; a infecção por HTLV-1 induz a expressão do gene da IL-6 mas não de IL- $\beta$ ,

TNF $\alpha$  e TGF- $\beta$  em células da tireóide; e as células tireoidianas infectadas por HTLV-1 proliferam mais rapidamente do que em células controles (Matsuda et al., 2005).

A prolina é um aminoácido hidrofóbico que não se adapta a uma estrutura secundária ordenada de um polipeptídeo e assim, em teoria, reduz a habilidade de *TP53* em ativar a apoptose (Lodish et al., 2003). Isto pode explicar o porquê da prolina em homozigose aumentar o risco de uma suscetibilidade individual para uma série de tumores da tireóide (Boltze et al., 2002; Granja et al., 2004).

Genótipos diferentes de *TP53* resultariam numa produção de p53 com conformação diferente e conseqüentemente, influenciam nas atividades de *TP53* (Jeffrey et al., 1995).

Em um estudo *in vitro*, usando fibroblastos primários de camundongo, Lowe e colaboradores observaram que o homozigoto selvagem e mutante, e heterozigotos de *TP53* mostram diferentes graus no efeito em modular a citotoxicidade de agentes anticâncer (Lowe et al., 1993).

Tanto a infecção por HHV-6 como a presença do polimorfismo do gene *TP53* ocorrem com maior freqüência em portadores de DG do que na população-controle, sugerindo que tal infecção possa ocorrer por reativação de um vírus latente em indivíduos que tenham algum dano na capacidade de *TP53* induzir apoptose. A detecção de HHV-6 e do polimorfismo do códon 72 de *TP53* podem identificar pacientes com maior risco de desenvolver DG, permitindo um eventual tratamento específico precoce e/ou medidas preventivas para esta doença.

## *CONCLUSÃO*

1. Investigamos o papel do HHV-6 e HHV-1 na suscetibilidade ao câncer de pele esporádico;
2. Verificamos a influência e potenciais interações de genes que codificam quatro importantes enzimas GST antioxidantes na suscetibilidade ao câncer de pele em brasileiros;
3. Investigamos a influência do códon 72 e códon 47 do gene *TP53* na suscetibilidade a infecção por HHV-6 e HHV-1 em pacientes imunossuprimidos pós-transplante;
4. Estudamos a relação entre a infecção por HHV-6, através do polimorfismo do códon 72 e a suscetibilidade a DG.

A partir dos dados obtidos podemos dizer que:

- a presença do HHV-6 e, principalmente, a detecção considerável de HHV-1 aumenta o risco para o câncer de pele não-melanoma em indivíduos infectados, sugerindo que esses vírus podem ter um papel na suscetibilidade a malignidades da pele, talvez através da reativação da infecção latente;
- há uma associação entre os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* e o risco para BCC. Embora o risco apresentado por esta associação tenha tido uma razão de chances relativamente pequenas, isto pode ajudar a compreender a base de fatores genéticos e ambientais conhecidos para predispor ao câncer de pele e, por esta razão, classificar indivíduos que merecem uma atenção médica especial. Além disso, estudos incluindo um número grande de pacientes são necessários para clarificar o papel desses genótipos na suscetibilidade ao câncer de pele e sua interação com agentes genotóxicos ou citotóxicos.

- a linhagem herdada de P72 aumenta o risco para a infecção de HHV-6. Além disso, procedimentos para uma simples genotipagem, utilizando amostras de sangue periférico podem ajudar a identificar indivíduos receptores de transplantes que podem se beneficiar de um tratamento preventivo para doenças, e um gerenciamento de programas de acompanhamento de infecções para pacientes transplantados pode ser feito;
- há uma tendência para o aumento de risco para desenvolvimento da DG quando associamos a infecção por HHV-6 e a presença do alelo prolina do códon 72 de *TP53*. Estas análises podem identificar pacientes com maior risco de desenvolver DG, permitindo um eventual tratamento específico precoce e/ou medidas preventivas para esta doença.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

Aberle SW, Mandl CW, Kunz C, Popow-Kraupp T. Presence of human herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. *J Clin Microbiol* 1996;34(12):3223-5.

Ablashi D, Agut H, Berneman Z, Campadelli-Fiume G, Carrigan D, Ceccerini-Nelli L, et al. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. *Arch Virol* 1993;129:1-4.

Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, Kramarsky B, et al. Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* 1991;184(2):545-52.

Ablashi DV, Eastman HB, Owen CB, Roman MM, Friedman J, Zabriskie JB, et al. Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients. *J Clin Virol* 2000;16(3):179-91.

Ablashi DV, Josephs SF, Buchbinder A, Hellman K, Nakamura S, Llana T, et al. Human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Virol Methods* 1988;21(1-4):29-48.

Aihara Y, Ito SI, Kobayashi Y, Yamakawa Y, Aihara M, Yokota S, et al. Carbamazepine-induced hypersensitivity syndrome associated with transient hypogammaglobulinaemia and reactivation of human herpesvirus 6 infection demonstrated by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 2003;149(1):165-9.

Akamine H, Takasu N, Komiya I, Ishikawa K, Shinjyo T, Nakachi K, et al. Association of HTLV-I with autoimmune thyroiditis in patients with adult T-cell leukaemia (ATL) and in HTLV-I carriers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;45(4):461-6.

Akhyani N, Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Eaton JM, McFarland HF, et al. Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. *J Infect Dis* 2000;182(5):1321-5.

Almahroos M, Kurban AK. Ultraviolet carcinogenesis in nonmelanoma skin cancer. Part I: incidence rates in relation to geographic locations and in migrant populations. *Skinmed* 2004;3:29-36.

Ames BN, Gold LS. Carcinogenesis debate. *Science* 1990;250(4987):1498-9.

Ames BN, Profet M, Gold LS. Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(19):7777-81.

Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Res* 1990;18(16):4961.

Arbel-Alon S, Menczer J, Feldman N, Glezerman M, Yeremin L, Friedman E, et al. Codon 72 polymorphism of p53 in Israeli Jewish cervical cancer patients and healthy women. *Int J Gynecol Cancer* 2002;12(6):741-4.

Arena A, Liberto MC, Capozza AB, Focà A. Productive HHV-6 infection in differentiated U937 cells: role of TNF alpha in regulation of HHV-6. *New Microbiol* 1997;20(1):13-20.

Asano Y, Nakashima T, Yoshikawa T, Suga S, Yazaki T. Severity of human herpesvirus-6 viremia and clinical findings in infants with exanthem subitum. *J Pediatr* 1991;118(6):891-5.

Asano Y, Yoshikawa T, Suga S, Yazaki T, Ozaki T, Saito Y, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgG antibody to human herpesvirus 6. *J Med Virol* 1990;32(2):119-23.

Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000;464(1):65-76.

Bandobashi K, Daibata M, Kamioka M, Tanaka Y, Kubonishi I, Taguchi H, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6)-positive Burkitt's lymphoma: establishment of a novel cell line infected with HHV-6. *Blood* 1997;90(3):1200-7.

Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *J Neurovirol* 2002;8(3):250-6.

Biberfeld P, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst* 1987;79(5):933-41.

Bodiwala D, Luscombe CJ, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, et al. Susceptibility to prostate cancer: studies on interactions between UVR exposure and skin type. *Carcinogenesis* 2003;24(4):711-7.

Boltze C, Roessner A, Landt O, Szibor R, Peters B, Schneider-Stock R, et al. Homozygous proline at codon 72 of p53 as a potential risk factor favoring the development of undifferentiated thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 2002;21(5):1151-4.

Braun DK, Dominguez G, Pellett PE. Human herpesvirus 6. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(3):521-67.

Braun DK, Pellett PE, Hanson CA. Presence and expression of human herpesvirus 6 in peripheral blood mononuclear cells of S100-positive, T cell chronic lymphoproliferative disease. *J Infect Dis* 1995;171(5):1351-5.

Brown NA, Sumaya CV, Liu CR, Ench Y, Kovacs A, Coronese M, et al. Fall in human herpesvirus 6 seropositivity with age. *Lancet* 1988;2(8607):396.

Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, et al. Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nat Genet* 2002;31(2):210-5.

Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, et al. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 1999;18(23):6845-54.

Burd EM, Carrigan DR. Human herpesvirus 6 (HHV-6)-associated dysfunction of blood monocytes. *Virus Res* 1993;29(1):79-90.

Burd EM, Knox KK, Carrigan DR. Human herpesvirus-6-associated suppression of growth factor-induced macrophage maturation in human bone marrow cultures. *Blood* 1993;81(6):1645-50.

Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 2000;21:405-26.

Buyru N, Tigli H, Dalay N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep* 2003;10(3):711-4.

Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001;277(1-2):15-30.

Cairey-Remonnay S, Humbey O, Mouglin C, Algros MP, Mauny F, Kanitakis J, et al. TP53 polymorphism of exon 4 at codon 72 in cutaneous squamous cell carcinoma and benign epithelial lesions of renal transplant recipients and immunocompetent individuals: lack of correlation with human papillomavirus status. *J Invest Dermatol* 2002;118(6):1026-31.

Campadelli-Fiume G, Mirandola P, Menotti L. Human Herpesvirus 6: An Emerging Pathogen. *Emerg Infect Dis* 1999;5(3):353-66.

Carbone M, Pass HI. Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? *Semin Cancer Biol* 2004;14(6):399-405.

Carless MA, Lea RA, Curran JE. The GSTM1 null genotype confers an increased risk for solar keratosis development in an Australian Caucasian population. *J Invest Dermatol* 2002;119:1373-8.

Carrigan DR. Human Herpesvirus-6 and bone marrow transplantation. *Blood* 1995;85:294-295.

Caruso A, Rotola A, Comar M, Favilli F, Galvan M, Tosetti M, et al. HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *J Med Virol* 2002;67(4):528-33.

Caselli E, Boni M, Bracci A, Rotola A, Cermelli C, Castellazzi M, et al. Detection of antibodies directed against human herpesvirus 6 U94/REP in sera of patients affected by multiple sclerosis. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4131-7.

Caserta MT, McDermott MP, Dewhurst S, Schnabel K, Carnahan JA, Gilbert L, et al. Human herpesvirus 6 (HHV-6) DNA persistence and reactivation in healthy children. *J Pediatr* 2004;145(4):478-84.

Cermelli C, Pietrosemoli P, Meacci M, Pecorari M, Sabbatini AM, Colombari B, et al. SupT-1: a cell system suitable for an efficient propagation of both HHV-7 and HHV-6 variants A and B. *New Microbiol* 1997;20(3):187-96.

Chan PK, Ng HK, Hui M, Cheng AF. Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. *J Med Virol* 2001;64(1):42-6.

Chen H, Pesce AM, Carbonari M, Ensoli F, Cherchi M, Campitelli G, et al. Absence of antibodies to human herpesvirus-6 in patients with slowly-progressive human immunodeficiency virus type 1 infection. *Eur J Epidemiol* 1992;8(2):217-21.

Chen M, Popescu N, Woodworth C, Berneman Z, Corbellino M, Lusso P, et al. Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *J. Virol* 1994;68:1173-1178.

Chiovato L, Pinchera A. Estresseful life events and Graves' disease. *Eur J Endocrinol* 1996;134(6):680-2.

Chiu SS, Cheung CY, Tse CY, Peiris M. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis* 1998;178(5):1250-6.

Chou SW, Scott KM. Rises in antibody to human herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay in transplant recipients with primary cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol* 1990;28(5):851-4.

Christie SN, McCaughey C, Marley JJ, Coyle PV, Scott DA, Lamey PJ. Recrudescence of herpes simplex infection mimicking primary herpetic gingivostomatitis. *J Oral Pathol Med* 1998;27(1):8-10.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332(20):1351-62.

Ciampolillo A, Marini V, Mirakian R, Buscema M, Schulz T, Pujol-Borrell R, et al. Retrovirus-like sequences in Graves' disease: implications for human autoimmunity. *Lancet* 1989;1(8647):1096-100.

- Clapper ML. Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep* 2000;2:251-6.
- Clark DA, Emery VC, Griffiths PD. Cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and human herpesvirus-7 in hematological patients. *Semin Hematol* 2003;40(2):154-62.
- Cone RW, Huang ML, Hackman RC, Corey L. Coinfection with human herpesvirus 6 variants A and B in lung tissue. *J Clin Microbiol* 1996;34(4):877-81.
- Cooper DS. The side effects of antithyroid drugs. *Endocrinologist* 1999;9:457-467.
- Corbellino M, Lusso P, Gallo RC, Parravicini C, Galli M, Moroni M. Disseminated human herpesvirus 6 infection in AIDS. *Lancet* 1993;342(8881):1242.
- Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses (1). *N Engl J Med* 1986;314(11):686-91.
- Corey L. First-episode, recurrent, and asymptomatic herpes simplex infections. *J Am Acad Dermatol* 1998;18:169-172.
- Dalkvist J, Wahlin TB, Bartsch E, Forsbeck M. Herpes simplex and mood: a prospective study. *Psychosom Med* 1995;57(2):127-37.
- De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on Human Herpesvirus 6 Biology, Clinical Features, and Therapy. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(1):217-245.
- de Moura Gallo CV, Mendonça GAS, de Moraes E, Olivier M, Hainaut P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res* 2005;589(3):192-207.
- Desachy A, Ranger-Rogez S, François B, Venot C, Traccard I, Gastinne H, et al. Reactivation of human herpesvirus type 6 in multiple organ failure syndrome. *Clin Infect Dis* 2001;32(2):197-203.
- Descamps V, Collot S, Houhou N, Ranger-Rogez S. Human herpesvirus-6 encephalitis associated with hypersensitivity syndrome. *Ann Neurol* 2003;53(2):280.
- Dewhurst S, Skrinicosky D, van Loon N. Alignment of the protein sequences of the serine proteases of human cytomegalovirus (HCMV), human herpesvirus 6 (HHV-6) and human herpesvirus 7 (HHV-7). *Expert Reviews in Molecular Medicine* 1997. <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/sdr/fig004sdr.htm>.

Di Luca D, Dolcetti R, Mirandola P, De Re V, Secchiero P, Carbone A, et al. Human herpesvirus 6: a survey of presence and variant distribution in normal peripheral lymphocytes and lymphoproliferative disorders. *J Infect Dis* 1994;170(1):211-5.

Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *J Med Microbiol* 2003;52(1):5-18.

Döhner K, Wolfstein A, Prank U. Function of dynein and dynactin in Herpes Simplex Virus capsid transport. *Mol Biol Cell* 2002;13(8):2795–809.

Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004;85(5):1301-12.

Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE. Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *J Virol* 1999;73(10):8040-52.

Donati D, Akhyani N, Fogdell-Hahn A, Cermelli C, Cassiani-Ingoni R, Vortmeyer A, et al. Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology* 2003;61(10):1405-11.

Drobyski WR, Dunne WM, Burd EM, Knox KK, Ash RC, Horowitz MM, et al. Human herpesvirus-6 (HHV-6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow-suppressive role for HHV-6 in vivo. *J Infect Dis* 1993;167(3):735-9.

Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003;33(3):357-65.

Eisen D, Essell J, Broun ER. Oral cavity complications of bone marrow transplantation. *Semin Cutan Med Surg* 1997;16(4):265-72.

Emmert DH. Treatment of common cutaneous herpes simplex virus infections. *Am Fam Physician* 2000;61(6):1697-706.

Epstein JB, Sherlock C, Page JL, Spinelli J, Phillips G. Clinical study of herpes simplex virus infection in leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70(1):38-43.

Eversole LR. Inflammatory diseases of the mucous membranes. Part 1. Viral and fungal infections. *J Calif Dent Assoc* 1994;22(4):52-7.

Eversole LR. Viral infections of the head and neck among HIV-seropositive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(2):155-63.

Feldstein AE, Razonable RR, Boyce TG, Freese DK, El-Youssef M, Perrault J, et al. Prevalence and clinical significance of human herpesviruses 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant* 2003;7(2):125-9.

Felley-Bosco E, Weston A, Cawley HM, Bennett WP, Harris CC. Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am J Hum Genet* 1993;53(3):752-9.

Fillet AM, Raphael M, Visse B, Audouin J, Poirel L, Agut H. Controlled study of human herpesvirus 6 detection in acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma. The French Study Group for HIV-Associated Tumors. *J Med Virol* 1995;45(1):106-12.

Flaitz CM, Hicks MJ. Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis. *Oral Oncology* 1998;34:448.

Foà-Tomasi L, Avitabile E, Ke L, Campadelli-Fiume G. Polyvalent and monoclonal antibodies identify major immunogenic proteins specific for human herpesvirus 7-infected cells and have weak cross-reactivity with human herpesvirus 6. *J Gen Virol* 1994;75(10):2719-27.

Fox JD, Briggs M, Ward PA, Tedder RS. Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* 1990;336(8715):590-3.

Fryer AA, Ramsay HM, Lovatt TJ. Polymorphisms in glutathione S-transferases and non-melanoma skin cancer risk in Australian renal transplant recipients. *Carcinogenesis* 2005;26:185-91.

Furlini G, Vignoli M, Ramazzotti E, Re MC, Visani G, La Placa. A concurrent human herpesvirus-6 infection renders two human hematopoietic progenitor (TF-1 and KG-1) cell lines susceptible to human immunodeficiency virus type-1. *Blood* 1996;87(11):4737-45.

Gattas GJ, Kato M, Soares-Vieira JA. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:451-8.

Glick M, Goldman HS. Viral infections in the dental setting: potential effects on pregnant HCWs. *J Am Dent Assoc* 1993;124(6):79-86.

Gold D, Corey L. Acyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31(3):361-7.

Goldman R, Shields PG. Food mutagens. *J Nutr* 2003;133( 3):965S-973S.

Gompels UA, Carrigan DR, Carss AL, Arno J. Two groups of human herpesvirus 6 identified by sequence analyses of laboratory strains and variants from Hodgkin's lymphoma and bone marrow transplant patients. *J Gen Virol* 1993;74(4):613-22.

Gompels UA, Luxton J, Knox KK, Carrigan DR. Chronic bone marrow suppression in immunocompetent adult by human herpesvirus 6. *Lancet* 1994;343(8899):735-6.

Gompels UA, Macaulay HA. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. *J Gen Virol* 1995;76(2):451-8.

Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, et al. The DNA Sequence of Human Herpesvirus-6: Structure, Coding Content, and Genome Evolution. *Virology* 1995;209(1)29-51.

Gough SC. The genetics of Graves' disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000;29(2):255-66.

Granja F, Morari EC, Assumpção LVM, Ward LS. GSTO polymorphism analyses in thyroid nodules suggest that GSTO1 variants do not influence the risk for malignancy. *Eur J Cancer Prev* 2005;14:277-80.

Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpção LV, Ward LS. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Letters* 2004;209: 129-37.

Granja F, Morari J, Morari EC, Correa LA, Assumpção LV, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 2004;210(2):151-7.

Greenberg MS. Herpesvirus infections. *Dent Clin North Am* 1996;40(2):359-68.

Griffiths PD. Herpesviruses and AIDS. *Scan. J. Infect. Dis* 1996;100:3-7.

Grivel JC, Ito Y, Fagà G, Santoro F, Shaheen F, Malnati MS, et al. Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med* 2001;7(11):1232-5.

Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000;77:81-137.

Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, Long C, Epstein LG, Insel RA, et al. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. *Clin Infect Dis* 1998;26(1):132-7.

Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, McDermott MP, Lofthus GK, Carnahan JA, et al. Characteristics and acquisition of human herpesvirus (HHV) 7 infections in relation to infection with HHV-6. *J Infect Dis* 2006;193(8):1063-9.

Hallas C, Neipel F, Huettner C, Schreiner D, Fleckenstein B, Müller-Hermelink HK. Presence of human herpesvirus type 6 in sporadic lymphoproliferative disorders. A comparative study. *Diagn Mol Pathol* 1996;5(3):166-72.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 1908;78:49-50.

Härmä M, Höckerstedt K, Lautenschlager I. Human herpesvirus-6 and acute liver failure. *Transplantation* 2003;76(3):536-9.

Hayashibara H, Tanimoto K, Nagata I, Harada Y, Shiraki K. Normal levels of IgG subclass in childhood determined by a sensitive ELISA. *Acta Paediatr Jpn* 1993;35(2):113-7.

He J, McCarthy M, Zhou Y, Chandran B, Wood C. Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *J Virol* 1996;70(2):1296-300.

Heagerty A, Smith A, English J. Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas: significant interactions between glutathione S-transferase GSTM1 genotypes, skin type and male gender. *Br J Cancer* 1996;73:44-8.

Herbein G, Strasswimmer J, Altieri M, Woehl-Jaegle ML, Wolf P, Obert G. Longitudinal study of human herpesvirus 6 infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996;22(1):171-3.

Hermouet S, Sutton CA, Rose TM, Greenblatt RJ, Corre I, Garand R, et al. Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma. *Leukemia* 2003;17(1):185-95.

Higashi K, Asada H, Kurata T, Ishikawa K, Hayami M, Spriatna Y, et al. Presence of antibody to human herpesvirus 6 in monkeys. *J Gen Virol* 1989;70(12):3171-6.

Hijikata Y, Tsukamoto Y. Effect of herbal therapy on herpes labialis and herpes genitalis. *Biotherapy* 1998;11(4):235-40.

[http://www.brown.edu/Courses/Bio\\_160/Projects2000/Herpes/Titlepages/Table-of-Contents.html](http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Herpes/Titlepages/Table-of-Contents.html).

<http://www.mapsofworld.com>.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SCIENCE96/gene.cgi?TP53>.

Inagi R, Guntapong R, Nakao M, Ishino Y, Kawanishi K, Isegawa Y, et al. Human herpesvirus 6 induces IL-8 gene expression in human hepatoma cell line, Hep G2. *J Med Virol* 1996;49(1):34-40.

Inoue N, Dambaugh TR, Pellett PE. Molecular biology of human herpesviruses 6A and 6B. *Infect Agents Dis* 1993;2(6):343-60.

Inoue Y, Yasukawa M, Fujita S. Induction of t-cell apoptosis by human herpesvirus 6, *J. Virol* 1997;71:3751-3759.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa nacional por amostra de domicílio. Rio de Janeiro: IBGE; 2003. v.1.

Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005.p.82. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=1>.

Irving WL, Cunningham AL, Keogh A, Chapman JR. Antibody to both human herpesvirus 6 and cytomegalovirus. *Lancet* 1988;2(8611):630-1.

Ishikawa K, Hasegawa K, Naritomi T, Kanai N, Ogawa M, Kato Y, et al. Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. *J Gastroenterol* 2002;37(7):523-30.

Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 1995;267(5203):1498-502.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, et al. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90(4):809-19.

Kanetsky PA, Holmes R, Walker A. Interaction of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:509-13.

Karp G. *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. New York: Ed. John Wiley & Sons; 2002.

Kasolo FC, Mpabalwani E, Gompels UA. Infection with AIDS-related herpesviruses in human immunodeficiency virus-negative infants and endemic childhood Kaposi's sarcoma in Africa. *J Gen Virol* 1997;78(4):847-55.

Katsafanas GC, Schirmer EC, Wyatt LS, Frenkel N. In vitro activation of human herpesviruses 6 and 7 from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(18):9788-92.

Kawai H, Inui T, Kashiwagi S, Tsuchihashi T, Masuda K, Kondo A, et al. HTLV-I infection in patients with autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis). *J Med Virol* 1992;38(2):138-41.

Kempf W, Adams V, Wey N, Moos R, Schmid M, Avitabile E, et al. CD68+ cells of monocyte/macrophage lineage in the environment of AIDS-associated and classic-sporadic Kaposi sarcoma are singly or doubly infected with human herpesviruses 7 and 6B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(14):7600-5.

Kerb R, Brockmoller J, Schlagenhauser R. Influence of GSTT1 and GSTM1 genotypes on sunburn sensitivity. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2:147-54.

Kesson AM. Use of aciclovir in herpes simplex virus infections. *J Paediatr Child Health* 1998;34(1):9-13.

Ketteler M, Kunter U, Floege J. An update on herpes virus infections in graft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1703.

Kim JW, Lee CG, Han SM, Kim KS, Kim JO, Lee JM, et al. Loss of heterozygosity of the retinoblastoma and p53 genes in primary cervical carcinomas with human papillomavirus infection. *Gynecol Oncol* 1997;67(2):215-21.

Klein G. Perspectives in studies of human tumor viruses, *Front. Biosci* 2002;7:268-74.

Knox KK, Carrigan DR. In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *J Infect Dis* 1992;165(5):925-9.

Knudsen LE, Loft SH, Autrup H. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res* 2001;482:83-8.

Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *J Gen Virol* 1991;72(6):1401-8.

Koutras DA, Karaiskos KS, Pipingos GD, Kitsopanides J, Boukis MA, Makriyannis D, et al. Treatment of endemic goitre with iodine and thyroid hormones, alone or in combination. (Preliminary report). *Endocrinol Exp* 1986;20(1):57-65.

Krueger GR, Ablashi DV. Human herpesvirus-6: a short review of its biological behavior. *Intervirology* 2003;46(5):257-69.

Krueger GR, Ablashi DV. Human Herpesvirus-6: General Virology, Epidemiology and Clinical Pathology- Perspectives in Medical Virology. Amsterdã Ed Elsevier; 2006. P.3-183. V.12.

Krueger GR, Manak M, Bourgeois N, Ablashi DV, Salahuddin SZ, Josephs SS, et al. Persistent active herpes virus infection associated with atypical polyclonal lymphoproliferation (APL) and malignant lymphoma. *Anticancer Res* 1989;9(6):1457-76.

Krueger GR, Wassermann K, De Clerck LS, Stevens WJ, Bourgeois N, Ablashi DV, et al. Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. *Lancet* 1990;336(8725):1255-6.

Krueger GRF, Ablashi DV, Whitman JJ. *Rev Med Hosp Gen Mexico* 1998; 61:226-240.

Lachmann R. Herpes simplex virus latency. *Expert Rev Mol Med* 2003;1-14.

Lachmann R. Organisation of the herpes simplex virus type 1 genome, showing the origin of latency-associated transcripts. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003;5(5). <http://www.expertreviews.org/03007002h.htm>.

Lachmann R. The herpes simplex virus life cycle. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2003;5(5):1. <http://www.expertreviews.org/03006987h.htm>.

LaCroix S, Stewart JA, Thouless ME, Black JB. An immunoblot assay for detection of immunoglobulin M antibody to human herpesvirus 6. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7(5):823-7.

Lagaye S, Vexiau P, Morozov V, Guénebaud-Claudet V, Tobaly-Tapiero J, Canivet M, et al. Human spumaretrovirus-related sequences in the DNA of leukocytes from patients with Graves disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(21):10070-4.

Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000;463:247-83.

Lane, DP. P53, guardian of the genome. *Nature* 2002;358: 15.

Langerød A, Bukholm IR, Bregård A, Lønning PE, Andersen TI, Rognum TO, et al. The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(12):1684-8.

Lautenschlager I, Linnavuori K, Höckerstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation* 2000;69(12):2561-6.

Lear JT, Smith AG, Strange RC. Detoxifying enzyme genotypes and susceptibility to cutaneous malignancy. *Br J Dermatol* 2000;142:8-15.

Leite JL, Manfrinatto JA, Mazzali M, Ward LS. Polymorphisms at exon 4 of p53 and the susceptibility to herpesvirus types 6 and 1 infection in renal transplant recipients. *Transpl Int* 2006;19(9):732-7.

Leite JL, Morari EC, Granja F, Campos GM, Guilhen AC, Ward LS. Influence of the glutathione s-transferase gene polymorphisms on the susceptibility to basal cell skin carcinoma. *Rev Med Chil* 2007;135(3):301-306.

Leite JL, Stolf HO, Reis NA, Ward LS. Human herpesvirus type 6 and type 1 infection increases susceptibility to nonmelanoma skin tumors. *Cancer Lett* 2005;224(2):213-9.

Li X, Dumont P, Della Pietra A, Shetler C, Murphy ME. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J Biol Chem* 2005;280(25):24245-51.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000;343:78-85.

Linde A, Dahl H, Wahren B, Fridell E, Salahuddin Z, Biberfeld P. IgG antibodies to human herpesvirus-6 in children and adults and in primary Epstein-Barr virus infections and cytomegalovirus infections. *J Virol Methods* 1988;21(1-4):117-23.

Lodish H, Baltimore D, Berk A. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. New York: WH Freeman and Company, 2003.

Lopez C, Pellett P, Stewart J, Goldsmith C, Sanderlin K, Black J, et al. Characteristics of human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 1988;157(6):1271-3.

Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74(6):957-67.

Luka J, Okano M, Thiele G. Isolation of human herpesvirus-6 from clinical specimens using human fibroblast cultures. *J Clin Lab Anal* 1990;4(6):483-6.

- Luo G, Fan JL, Seetharamaiah GS, Desai RK, Dallas JS, Wagle N, et al. Immunization of mice with *Yersinia enterocolitica* leads to the induction of antithyrotropin receptor antibodies. *J Immunol* 1993;151(2):922-8.
- Lupi O, Silva AG, Pereira Jr. AC. Herpes simplex vírus typ 2 in Brazil: Seroepidemiologic survey. *Int J Dermatol* 1996;35(11):794-6.
- Luppi M, Barozzi P, Garber R, Maiorana A, Bonacorsi G, Artusi T, et al. Expression of human herpesvirus-6 antigens in benign and malignant lymphoproliferative diseases. *Am J Pathol* 1998;153(3):815-23.
- Luppi M, Barozzi P, Maiorana A, Marasca R, Torelli G. Human herpesvirus 6 infection in normal human brain tissue. *J Infect Dis* 1994;169(4):943-4.
- Lusso P, Markham PD, DeRocco SE, Gallo RC. In vitro susceptibility of T lymphocytes from chimpanzees (*Pan troglodytes*) to human herpesvirus 6 (HHV-6): a potential animal model to study the interaction between HHV-6 and human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J Virol* 1990;64(6):2751-8.
- Lusso P, Markham PD, Tschachler E, di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ, Ablashi DV, et al. In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *J Exp Med* 1988;167(5):1659-70.
- Lusso P, Secchiero P, Crowley RW, Garzino-Demo A, Berneman ZN, Gallo RC. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(9):3872-6.
- Lusso P, Secchiero P, Crowley RW. In vitro susceptibility of *Macaca nemestrina* to human herpesvirus 6: a potential animal model of coinfection with primate immunodeficiency viruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994;10(2):181-7.
- Mannervik B. The isozymes of glutathione S-transferase. *Adv Enzymol* 1985;57:357-417.
- Matsuda T, Tomita M, Uchihara JN, Okudaira T, Ohshiro K, Tomoyose T, et al. Human T cell leukemia virus type I-infected patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(10):5704-10.

Meyers JD, Wade JC, Mitchell CD, Saral R, Lietman PS, Durack DT, et al. Multicenter collaborative trial of intravenous acyclovir for treatment of mucocutaneous herpes simplex virus infection in the immunocompromised host. *Am J Med* 1982;73(1A):229-35.

Meyers JD. Treatment of herpesvirus infections in the immunocompromised host. *Scand J Infect Dis Suppl* 1985;47:128-36.

Miller CS, Danaher RJ, Jacob RJ. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(4):541-62.

Mizokami T, Okamura K, Ikenoue H, Sato K, Kuroda T, Maeda Y, et al. A high prevalence of human T-lymphotropic virus type I carriers in patients with antithyroid antibodies. *Thyroid* 1994;4(4):415-9.

Morari EC, Leite JL, Granja F, da Assumpção LV, Ward LS. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Bio & Prev* 2002;11:1485-8.

Morari EC, Lima AB, Bufalo NE, Leite JL, Granja F, Ward LS. Role of glutathione-S-transferase and codon 72 of P53 genotypes in epithelial ovarian cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132(8):521-8.

Motley R, Kersey P, Lawrence C. Multi-professional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2002;146:18-25.

Mrázek J, Karlin S. Strand compositional asymmetry in bacterial and large viral genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(7):3720-5.

Muralidhar S, Doniger J, Mendelson E, Araujo JC, Kashanchi F, Azumi N, et al. Human cytomegalovirus MTRII oncoprotein binds to p53 and down-regulates p53-activated transcription. *J Virol* 1996;70:8691.

Nascimento H, Coy CS, Teori MT. Possible influence of glutathione S-transferase GSTT1 null genotype on age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003;46:510-15.

Nevins JR, Vogt PK. Cell transformation by viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p.301-35.

Newton-Bishop JA, Corrie PG, Evans J, Gore ME, Hall PN, Kirkham N, et al. UK guidelines for the management of cutaneous melanoma. Br J Plast Surg 2002;55:46–54.

Nielsen PS, de Pater N, Okkels H, Autrup H. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers-effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. Carcinogenesis 1996;17(5):1021-7.

Nitsche A, Müller CW, Radonic A, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G, et al. Human herpesvirus 6A DNA Is detected frequently in plasma but rarely in peripheral blood leukocytes of patients after bone marrow transplantation. J Infect Dis 2001;183(1):130-3.

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. Cell 2000;102(6):849-62.

Okamura S, Arakawa H, Tanaka T, Nakanishi H, Ng CC, Taya Y, et al. p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis. Mol Cell 2001;8(1):85-94.

Okuno T, Higashi K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Kokado Y, et al. Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. Transplantation 1990;49(3):519-22.

Ollier W, Davies E, Snowden N. Association of homozygosity for glutathione-S-transferase GSTM1 null alleles with the Ro+/La- autoantibody profile in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1996;39:1763-4.

Orgiazzi J. Anti-TSH receptor antibodies in clinical practice. Endocrinol Metab Clin North Am 2000;29(2):339-55.

Osiowy C, Prud'homme I, Monette M, Zou S. Detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by a microplate PCR-hybridization assay. J Clin Microbiol 1998;36(1):68-72.

Ozaki Y, Tajiri H, Tanaka-Taya K, Mushiake S, Kimoto A, Yamanishi K, et al. Frequent detection of the human herpesvirus 6-specific genomes in the livers of children with various liver diseases. J Clin Microbiol 2001;39(6):2173-7.

Palli D, Vineis P, Russo A, Berrino F, Krogh V, Masala G, et al. Diet, metabolic polymorphisms and dna adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study. *Int J Cancer* 2000;87(3):444-51.

Papadakis ED, Soultzis N, Spandidos DA. Association of p53 codon 72 polymorphism with advanced lung cancer: the Arg allele is preferentially retained in tumours arising in Arg/Pro germline heterozygotes. *Br J Cancer* 2002;87(9):1013-8.

Papanikolaou E, Kouvatsis V, Dimitriadis G, Inoue N, Arsenakis M. Identification and characterization of the gene products of open reading frame U86/87 of human herpesvirus 6. *Virus Res* 2002;89(1):89-101.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94(2):153-6.

Parkin DM, Muir CS. Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data. *IARC Sci Publ* 1992;(120):45-173.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. *Cancer Incidence in Five Continents VIII* (2002).

Pass R. Herpesvirus infections in transplant recipients. *Herpes* 2000; 7: 3.

Patnaik M, Komaroff AL, Conley E, Ojo-Amaize EA, Peter JB. Prevalence of IgM antibodies to human herpesvirus 6 early antigen (p41/38) in patients with chronic fatigue syndrome. *J Infect Dis* 1995;172(5):1364-7.

Patton LL, van der Horst C. Oral infections and other manifestations of HIV disease. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13(4):879-900.

Poeschla EM, Wong-Staal F. Etiology of Cancer: viruses. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers;1997. p.153-84.

Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA* 1993;269(4):479-82.

Rajcani J, Yanagihara R, Godec MS, Nagle JW, Kudelova M, Asher DM. Low-incidence latent infection with variant b or roseola type human herpesvirus 6 in leukocytes of healthy adults. *Arch Virol* 1994;134:357-368.

Randhawa PS, Jenkins FJ, Nalesnik MA, Martens J, Williams PA, Ries A, et al. Herpesvirus 6 variant A infection after heart transplantation with giant cell transformation in bile ductular and gastroduodenal epithelium. *Am J Surg Pathol* 1997;21(7):847-53.

Razonable RR, Fanning C, Brown RA, Espy MJ, Rivero A, Wilson J, et al. Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant a occurs in critically ill immunocompetent hosts. *J Infect Dis* 2002;185(1):110-3.

Razzaque A, Francillon Y, Jilly PN, Varricchio F. Detection of human herpesvirus 6 sequences in lymphoma tissues by immunohistochemistry and polymerase chain reactions. *Cancer Lett* 1996;106(2):221-6.

Riley LE. Herpes simplex virus. *Semin Perinatol* 1998;22(4):284-92.

Robles AI, Harris CC. p53-mediated apoptosis and genomic instability diseases. *Acta Oncol* 2001;40:696.

Rogounovitch TI, Saenko VA, Ashizawa K, Sedliarou IA, Namba H, Abrosimov AY, et al. TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. *Oncol Rep* 2006;15(4):949-56.

Rossini A, Rapozo DC, Amorim LM. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2002;1:233-40.

Rotola A, Merlotti I, Caniatti L, Caselli E, Granieri E, Tola MR, et al. Human herpesvirus 6 infects the central nervous system of multiple sclerosis patients in the early stages of the disease. *Mult Scler* 2004;10(4):348-54.

Roush KS, Domiati-Saad RK, Margraf LR, Krisher K, Scheuermann RH, Rogers BB, et al. Prevalence and cellular reservoir of latent human herpesvirus 6 in tonsillar lymphoid tissue. *Am J Clin Pathol* 2001;116(5):648-54.

Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986;234(4776):596-601.

Sanchez-Prieto R, Rojas JM, Taya Y, Gutkind JS, et al. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic estresse by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 2000;60(9):2464-72.

Santoro F, Kennedy P, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P, et al. CD46 is a cellular receptor for Human Herpesvirus 6. *Cell* 1999;23(7):817-27.

Saxinger C, Polesky H, Eby N, Grufferman S, Murphy R, Tegtmeir G, et al. Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in U.S. populations. *J Virol Methods* 1988;21(1-4):199-208.

Schonnebeck M, Krueger GR, Braun M, Fischer M, Koch B, Ablashi DV, et al. Human herpesvirus-6 infection may predispose cells to superinfection by other viruses. *In Vivo* 1991;5(3):255-63.

Schottenfeld D, Beebe-Dimmer JL. Advances in cancer epidemiology: understanding causal mechanisms and the evidence for implementing interventions. *Annu Rev Public Health* 2005;26:37-60.

Scott DA, Coulter WA, Biagioni PA, O'Neill HO, Lamey PJ. Detection of herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity by polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay at the prodromal stage of recrudescence herpes labialis. *J Oral Pathol Med* 1997;26(7):305-9.

Scully C. Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:337-347.

Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, Benedetti L, Crowley RW, Komaroff AL, et al. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995;171(2):273-80.

Singer PA, Cooper DS, Levy EG, Ladenson PW, Braverman LE, Daniels G, et al. Treatment guidelines for patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. Standards of Care Committee, American Thyroid Association. JAMA 1995;273(10):808-12.

Singh N, Carrigan DR, Gayowski T, Singh J, Marino IR. Variant B human herpesvirus-6 associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient. Transplantation 1995;60(11):1355-7.

Sloots TP, Kapeleris JP, Mackay IM, Batham M, Devine PL. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum immunoglobulin G response to human herpesvirus 6. J Clin Microbiol 1996;34(3):675-9.

Smith SR, Butterly DW, Alexander BD, Greenberg A. Viral infections after transplantation. Am J Kidney Dis 2001;37:659.

Sokol DM, Garry RF. Herpesviruses. In: Borchardt KA & Noble MA. Sexually Transmitted Diseases: Epidemiology, Pathology, Diagnosis, and Treatment. New York: CRC Press, 1997:217-43.

Steward B, Kleihues P. Eds. World Cancer Report, IARC Press, IARC, 2003.

Stewart JA, Reef SE, Pellett PE, Corey L, Whitley RJ. Herpesvirus infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1995;21(Suppl 1):S114-20.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature 1998;393(6682):229-34.

Suga S, Yazaki T, Kajita Y, Ozaki T, Asano Y. Detection of human herpesvirus 6 DNAs in samples from several body sites of patients with exanthem subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay. J Med Virol 1995;46(1):52-5.

Suga S, Yoshikawa T, Asano Y, Kozawa T, Nakashima T, Kobayashi I, et al. Clinical and virological analyses of 21 infants with exanthem subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. Ann Neurol 1993;33(6):597-603.

Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, Kondo T, Takahashi H, Takahashi M, et al. Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *J Virol* 1989;63:3161-3.

Takekawa M, Adachi M, Nakahata A, Nakayama I, Itoh F, Tsukuda H, et al. p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J* 2000;19(23):6517-26.

Takemoto M, Mori Y, Ueda K, Kondo K, Yamanishi K. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *J Gen Virol* 2004;85(4):869-79.

Takemoto M, Shimamoto T, Isegawa Y, Yamanishi K. The R3 region, one of three major repetitive regions of human herpesvirus 6, is a strong enhancer of immediate-early gene U95. *J Virol* 2001;75:10149.

Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Hasegawa T. Functional characterization of two variant human GSTO1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:516-20.

Tanaka-Taya K, Kondo T, Mukai T, Miyoshi H, Yamamoto Y, Okada S, et al. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1996;48(1):88-94.

Telfer NR, Colver GB, Bowers PW. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 1999;141:415-423.

Thilly WG. Have environmental mutagens caused oncomutations in people? *Nat Genet* 2003;34(3):255-9.

Tomer Y, Davies TF. Infection, thyroid disease, and autoimmunity. *Endocr Rev* 1993;14(1):107-20.

Tomer Y, Davies TF. Infections and autoimmune endocrine disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1995;9(1):47-70.

Tomsone V, Logina I, Millers A, Chapenko S, Kozireva S, Murovska M. Association of human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 with demyelinating diseases of the nervous system. *J Neurovirol* 2001;7(6):564-9.

Torelli G, Marasca R, Luppi M, Selleri L, Ferrari S, Narni F, et al. Human herpesvirus-6 in human lymphomas: identification of specific sequences in Hodgkin's lymphomas by polymerase chain reaction. *Blood* 1991;77(10):2251-8.

Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham survey. *Clin Endocrinol* 1977;7(6):481-93.

Tyler KL, Fields BN. Pathogenesis of viral infection. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.173-203.

Vestey JP, Norval M. Mucocutaneous infections with herpes simplex virus and their management. *Clin Exp Dermatol* 1992;17(4):221-37.

Vineis P. Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective. *Carcinogenesis* 2003;24:1-6.

Vineis P. Diet, genetic susceptibility and carcinogenesis. *Public Health Nutr* 2001;4(2B):485-91.

Vineis P. Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene* 2004;23(38):6477-83.

Volpe R. Subacute (de Quervain's) thyroiditis. *Clin Endocrinol Metab* 1979;8(1):81-95.

Vousden KH, Farrell PJ. Viruses and human cancer. *Br Med Bull* 1994;50:560-81.

Wainwright MS, Martin PL, Morse RP, Lacaze M, Provenzale JM, Coleman RE, et al. Human herpesvirus 6 limbic encephalitis after stem cell transplantation. *Ann Neurol* 2001;50(5):612-9.

Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997;26(1):189-218.

Ward KN, Sheldon MJ, Gray JJ. Primary and recurrent cytomegalovirus infections have different effects on human herpesvirus-6 antibodies in immunosuppressed organ graft

recipients: absence of virus cross-reactivity and evidence for virus interaction. *J Med Virol* 1991;34(4):258-67.

Ward KN. Human herpesviruses-6 and -7 infections. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(3):247-52.

Ward LS. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2002;46(4):351-360.

Weetman AP. Graves' disease. *N Engl J Med* 2000;343(17):1236-48.

Weinberg W. Uber den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahreshefte Verein f vaterl Naturk in wurtemberg* 1908;64:368-82.

Werner J, Gelderblom H. Isolation of foamy virus from patients with de Quervain thyroiditis. *Lancet* 1979;2(8136):258-9.

Whitbread AK, Tetlow N, Eyre HJ. Characterization of the human omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2003;13:131-44.

Wick G, Grubeck-Loebenstein B, Trieb K, Kalischnig G, Aguzzi A. Human foamy virus antigens in thyroid tissue of Graves' disease patients. *Int Arch Allergy Immunol* 1992;99(1):153-6.

Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, et al. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* 1988;1(8594):1065-7.

Yanagi K, Harada S, Ban F, Oya A, Okabe N, Tobinai K. High prevalence of antibody to human herpesvirus-6 and decrease in titer with increase in age in Japan. *J Infect Dis* 1990;161(1):153-4.

Yasukawa M, Inoue Y, Ohminami H, Sada E, Miyake K, Tohyama T, et al. Human herpesvirus 7 infection of lymphoid and myeloid cell lines transduced with an adenovirus vector containing the CD4 gene. *J Virol* 1997;71(2):1708-12.

Yasukawa M, Inoue Y, Ohminami H, Terada K, Fujita S. Apoptosis of CD4+ T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection. *Gen Virol* 1998;79 ( Pt 1):143-7.

Yoshida M, Torigoe S, Ikeue K, Yamada M. Neutralizing antibody responses to human herpesviruses 6 and 7 do not cross-react with each other, and maternal neutralizing antibodies contribute to sequential infection with these viruses in childhood. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(2):388-93.

Yoshida M, Torigoe S, Yamada M. Elucidation of the cross-reactive immunoglobulin M response to human herpesviruses 6 and 7 on the basis of neutralizing antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9(2):394-402.

Yoshikawa T, Akimoto S, Nishimura N. Evaluation of active human herpesvirus 6 infection by reverse transcription-PCR. *2003;70(2):183-336.*

Yoshikawa T, Asano Y, Akimoto S, Ozaki T, Iwasaki T, Kurata T, et al. Latent infection of human herpesvirus 6 in astrocytoma cell line and alteration of cytokine synthesis. *J Med Virol* 2002;66(4):497-505.

Yoshikawa T, Black JB, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Iida K, et al. Comparison of specific serological assays for diagnosing human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(1):170-3.

Yoshikawa T, Suga S, Asano Y, Nakashima T, Yazaki T, Ono Y, et al. A prospective study of human herpesvirus-6 infection in renal transplantation. *Transplantation* 1992;54(5):879-83.

Yoshikawa T, Suzuki K, Umemura K. Atypical clinical features of a human herpesvirus-6 infection in a neonate. *J Med Virol* 2004;74(3):369-513.

Yoshikawa T. Human herpesvirus-6 and -7 infections in transplantation. *Pediatric Transplantation* 2003;7(1):11-17.

Zafiroopoulos A, Tsenteliero E, Billiri K, Spandidos DA. Human Herpesviruses in non-melanoma skin cancers. *Cancer Lett* 2003;198:77-81.

Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, Boeckh M. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005;40(7):932-40.

Zerr DM, Meier AS, Selke SS, Frenkel LM, Huang ML, Wald A, et al. A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection. *N Engl J Med* 2005;352(8):768-76.

Zhen Z, Bradel-Tretheway B, Sumagin S, Bidlack JM, Dewhurst S. The human herpesvirus 6 G protein-coupled receptor homolog U51 positively regulates virus replication and enhances cell-cell fusion in vitro. *J Virol* 2005;79(18):11914-24.

zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(4):252-3.

***ANEXOS***



CEP, 17/08/04  
(PARECER PROJETO Nº 072/1998)

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

✉ [cep@fcm.unicamp.br](mailto:cep@fcm.unicamp.br)

**PARECER**

**I-IDENTIFICAÇÃO:**

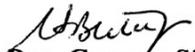
**PROJETO: "GENES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNIA DAS NEOPLASIAS"**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Laura Sterian Ward

**II - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que altera o título para "**GENES ENVOLVIDOS NA PATOGENIA DAS NEOPLASIAS E DOENÇAS CRÔNICAS**", bem como acrescentar a tese de doutorado intitulada "PERFIL GENOTÍPICO DE PACIENTES COM DOENÇA DE GRAVES E SUA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA TERAPÊUTICA" do aluno Roberto B. Santos e de iniciação científica da aluna Joseane Morari e a tese de doutorado intitulada "INFLUÊNCIA DO PERFIL GENOTÍPICO DE p53 E DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DE ORF-1 NA LESÃO NEOPLASIA ASSOCIADA AO HERPESVIRUS TIPO 6", referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

  
**Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

## Human herpesvirus type 6 and type 1 infection increases susceptibility to nonmelanoma skin tumors

Janaína Luisa Leite<sup>a</sup>, Hamilton Ometto Stolf<sup>b</sup>, Nilton Ávila Reis<sup>a</sup>, Laura S. Ward<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Cancer Molecular Genetics, Department of Medicine, School of Medicine, State University of Campinas (Unicamp), 45 Olympio Pattaro, Campinas, São Paulo 13085-045, Brazil

<sup>b</sup>Dermatology, Department of Medicine, School of Medicine, State University of São Paulo (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil

Received 6 July 2004; received in revised form 1 November 2004; accepted 4 November 2004

### Abstract

In order to investigate herpesvirus (HHV) role in the susceptibility to skin cancer, we compared HHV6 and HHV1 incidence in DNA samples extracted from 120 lesions and 41 normal skin tissues. HHV6 (31.7%) and HHV1 (23.8%) were detected more frequently in skin cancer than in control individuals (14.6 and 5%, respectively) ( $P=0.0391$  and  $P=0.00094$ , respectively). The risk of presenting basal cell carcinomas (BCC) was more than 3 times higher for HHV-6 infected patients (OR=3.182; 95% CI: 1.125–8.997). The risk for HHV-1 infected individuals of presenting BCC and squamous cell carcinomas was increased 8 and 6 times, respectively (OR=8.125; 95% CI: 1.735–38.043 and OR=6.290; 95% CI: 1.283–30.856, respectively).

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Herpesvirus; Cutaneous; Cancer; Infection; Virus; Susceptibility

### 1. Introduction

Virus infections have emerged, in the past few years, as major causal cancer factors. Some of these cancers are very common, leading to the assumption that up to 20% of all cancers worldwide may have a viral etiology, including hepatitis B virus-related hepatocarcinomas, Epstein-Barr virus, human papillomavirus, human T-cell leukemia virus type 1 and hepatitis C virus, plus several candidate human cancer viruses [1,2]. Tumor viruses establish long-term

persistent infections in humans, and cancer is usually an accidental side effect of viral replication strategies. Viruses are usually incomplete carcinogens, and the known human cancer viruses display different roles in cell transformation [3]. There is strong evidence that viral infections may affect the cellular DNA repair system, supposedly allowing the accumulation of mutations in growth regulatory genes. Also, processes and reactants associated with a virus-induced inflammatory response may predispose to cancer. It is possible that other normal mechanisms of host homeostasis and response to infection, under the pressure of chronic viral replication, may go awry and promote tumor outgrowth. Finally, the hit-and-run

\* Corresponding author. Tel./fax: 55 19 3788 8020.

E-mail address: [ward@unicamp.br](mailto:ward@unicamp.br) (L.S. Ward).

mechanism of viral involvement in carcinogenesis cannot be ruled out, although the concept that a virus can initiate the transformation process through a mutagenic mechanism and then disappear without leaving viral traces has fallen out of favor [3].

Both human herpes virus type 6 (HHV6) and type 1 (HHV1), also denominated human herpes simplex virus, are epitheliotropic by nature and their life cycle is closely linked to the terminal differentiation of the squamous cells. They are found worldwide and are among the most frequent causes of viral infections in immunocompetent as well as in immunocompromised patients but, unlike Epstein Barr and Kaposi Sarcoma virus, HHV1 and HHV6 are not definitively associated with cancer [4–7]. On the other hand, HHV6 has been detected in oral squamous carcinomas, cervical carcinomas, Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas among other malignancies [8,9]. Also, neoplastic transformation of nontumorigenic human epidermal keratinocytes and murine fibroblasts was demonstrated with HHV6 DNA [10]. These facts suggest that HHV6 may have some role in the development of human malignancies of the skin. The mechanism involved in HHV6 associated malignancy may be related to the fact that, in both immunocompetent and immunosuppressed hosts, HHV6 produces an oncogenic protein called ORF-1 (open reading frame 1) that binds to wild-type p53 and inhibits regulation of the cell cycle [11,12]. HHV1 can infect both skin and nerves and develop latent infection within the dorsal root and trigeminal ganglia [13]. HHV1 was also associated with many types of cancer, including squamous cell carcinomas, and there is evidence that the virus may determine genetic cellular modification *in vitro* and in experimental *in vivo* models [11,14,15].

This study was designed to investigate the role of HHV6 and HHV1 in the susceptibility to sporadic skin cancers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

The study was approved by the Ethics Committees of the School of Medicine, State University of São Paulo-Botucatu (UNESP), and informed written consent was obtained from all individuals.

One hundred-twenty adult individuals (56 females and 64 males, 11–92 years old,  $63.8 \pm 15.7$  years old) consecutively referred to the outpatient Surgical Dermatology Clinic of UNESP because of skin conditions were enrolled in the study after agreeing to participate. There were 51 basal cell carcinomas (BCC), 41 squamous cell carcinomas (SCC) and 9 malignant melanomas (MM). Nineteen lesions were classified as benign: 5 keratoacanthomas, 12 actinic keratoses and 2 melanocytic nevi. Surgical excision margins were drawn by the surgeon (HOS) according to current guidelines [16–18]. We were able to obtain lesion samples from each patient and also a normal portion of adjacent skin. Type of tumors and grade of differentiation, with particular attention to the cases classified as benign, were obtained from surgical and pathological records. Diagnoses were all reviewed and confirmed by experienced pathologists of UNESP.

A subgroup of 25 skin lesion patients was considered immunocompromised because of organ transplantation ( $n=11$  cases), use of immunosuppressive therapy ( $n=9$  cases) or other advanced

Table 1

Clinical features including age ( $X \pm SD$  and range in years), gender (F, female; M, male) and color (W, white; NW, non-white) among individuals from the control group, patients with benign skin lesions, basal cell carcinomas (BCC), squamous cell carcinomas (SCC) and malignant melanomas (MM)

	Age ( $X \pm SD$ )	Age range	Sex		Color	
			M	F	W	NW
Controls	46.7 $\pm$ 5.3	21–52	19	22	39	2
Benign	61.38 $\pm$ 16.06	21–86	11	8	19	0
BCC	65.88 $\pm$ 11.62	45–90	26	25	49	2
SCC	59.82 $\pm$ 19.45	11–92	24	17	41	0
MM	74.33 $\pm$ 11.30	51–88	3	6	8	1

malignancies ( $n=5$  cases). There were 9 BCC, 10 SCC, 1 MM and 5 benign lesions.

A control group of healthy skin donors from the general population of our region with no skin conditions was very hard to obtain. We aimed to obtain a control group comparable to the cutaneous lesion group of patients with respect to gender proportion, age and color recruiting 41 healthy volunteers as described in Table 1. However, older skin donors were very hard to obtain.

Because of the high heterogeneity of our population, patients and controls were classified into whites and non-whites. Data on general health conditions and medical history with emphasis on previous and/or current medical conditions, especially organ transplantation, immunosuppressive therapy, other malignancies and Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection were obtained through interviews, using a structured questionnaire administered by the same interviewers that also performed a careful physical exam.

## 2.2. Methods

Tumor samples were obtained from a central portion of the tumor in order to minimize the possibility of normal tissue contamination. Selection of appropriate tissue was based on the macroscopic evaluation at the time of collection. Also, we obtained samples from visually normal autologous adjacent skin tissue. DNA was obtained using proteinase k digestion and phenol–chloroform extraction standard methods.

HHV1 sequences were obtained by PCR using one set of primers (5'-TGCTCCTAC AACAAGTCTCTGGG-3'/5'-CGGTGCTCCAGGATAAACTGTG-3') that amplified a target sequence of 199 bp. PCR was performed in 25  $\mu$ l volumes of a mixture containing 200 ng DNA, 10  $\mu$ M of each primer, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dinucleotide triphosphate and 3.0 U Taq DNA Polymerase. Amplifications were carried out for 35 cycles at 94 °C for 30 s, 60.5 °C for 20 s and 72 °C for 30 s, with an initial denaturation step at 94 °C for 3 min and a final extension step of 72 °C for 10 min. (Fig. 1a). In order to amplify HHV6 sequences, we used two sets of nested primers. The first set was designed to amplify a highly conserved sequence

corresponding to the major capsid protein gene. It consisted of an outer pair of primers, A1 and A2, and an inner pair of primers, A3 and A4. Primers A1 and A2 defined a target sequence of 520 bp, whereas A3 and A4 amplified a 258 bp fragment. The second set of primers was designed to amplify the region shown to encode a putative large tegument protein, and consisted of an outer pair of primers, B1 and B2, and an inner pair, B3 and B4. Primers B1 and B2 defined

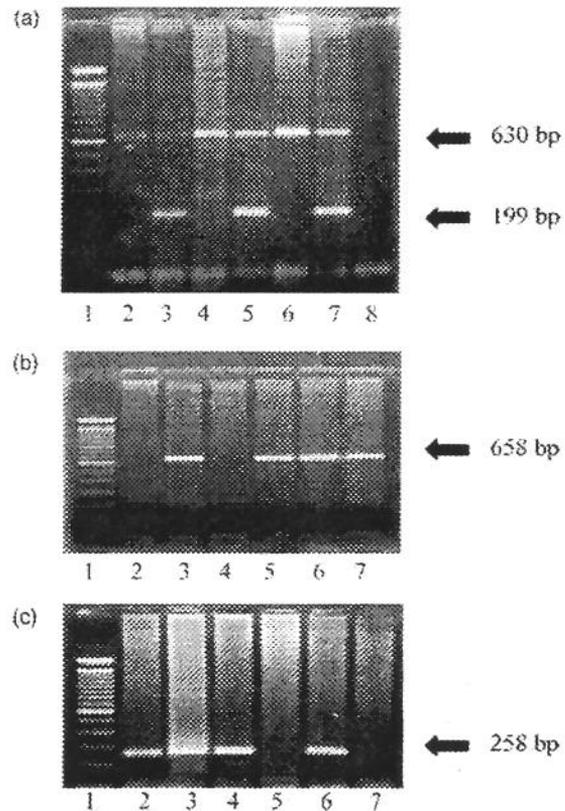


Fig. 1. Agarose gel for detection of HHV-6 and HHV-1 fragments. Ethidium bromide-stained 2% agarose gel illustrating in panel *a* the PCR used for human simplex herpesvirus type 1 (HHV-1) detection. The 199 bp bands correspond to HHV-1 and the 630 bp bands correspond to a  $\beta$ -globin gene fragment that was used as a positive control for amplification. In panels *b* and *c*, we illustrate the results of the nested PCR used for human herpesvirus type 6 (HHV-6) detection. The 658 bp bands correspond to the product of HHV-6 viral tegument and the 258 bp bands to the viral capsid sequences, respectively. The first columns were loaded with a DNA size marker ladder of 100 bp. Columns 2–4 were loaded with DNA extracted from BCC samples and columns 5–7 with DNA extracted from SCC specimens. Column 8 in panel *a* is a negative control of the reaction.

a target sequence of 834 bp, while primers B3 and B4 amplified a 658 bp fragment. All PCR reactions were performed in a programmable DNA thermal cycler (Perkin–Elmer) with a final volume of 25  $\mu$ l including 200 ng of DNA, 50 mM KCl, 20 mM Tris–HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, and 3 U of Taq DNA Polymerase (Life Technologies GIBCO BRL). A1/A2 (5′-GCGTTTTTCAGTGTGTAGTTTCGGCAG-3′/5′-TGGCCGCATTCGTACAGATACGGAGG-3′) primer concentration was 25  $\mu$ M and the annealing temperature was set to 56 °C. After 35 cycles, 2  $\mu$ l of this PCR product were used as template for a second round of amplification using A3/A4 (5′-GCTA-GAACGTATTTGCTGCAGAACG-3′/5′-ATCCGA-AACAAGTGT CTGACTGGCA-3′) in the same conditions. When the B set of nested primers was used, the first reaction was performed with 25  $\mu$ M of each outer primer, B1/B2 (5′-GTGGATCCG ACGTCCTACAAACAC-3′/5′-CGGTGTCACACA-GCATGAACTCTC-3′), and 30 cycles with annealing temperature of 58 °C. After the first amplification, 2  $\mu$ l of the PCR product were used as a target to generate an internal amplicon using primers B3/B4 (5′-GGAGAA TCTTGTAAGTATATGGTC-3′/5′-CTCGGACTCATAGATCTCATACTG-3′), and 20 cycles with annealing temperature of 58 °C. Ten additional cycles were added with an annealing temperature of 54 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 2 min. To avoid possible contamination of PCR mixtures, all reactions were calibrated with PCR mix without DNA and water as negative controls, and  $\beta$ -globin gene amplification as a positive control for DNA quality. Positive HHV1 and HHV6 controls were obtained from patients with active clinical infections and positive serological tests (fluorescent antibody test—FAT and enzyme-linked immunoassay—ELISA, respectively); negative controls obtained from patients with no history of herpesvirus infection and negative serological tests were also included in all PCR reactions.

The amplification PCR products were visualized on 2% agarose gels containing ethidium bromide and were scored for the presence or absence of the 199 bp (from HHV1), 258 bp (from HHV6 capsid protein) and 658 bp (from HHV6 tegument protein) fragments (Fig. 1b and c).

The PCR products of 6 samples that were positive for HHV6 and another 6 positive samples for HHV1

were directly sequenced using the ABI prism big dye sequencing kit (Perkin–Elmer, Warrington, Cheshire, UK) and the ABI 377 Prism DNA Sequencer (Perkin–Elmer). All products were confirmed to be the predicted sequence of the corresponding viruses.

### 2.3. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using SAS (Statistical Analysis System, version 8.1, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA, 1999–2000). Chi-square ( $\chi^2$ ) or Fisher's (F) exact tests were used to examine homogeneity between groups regarding gender, color and position of skin lesions. Kruskal–Wallis (KW) test was used to compare age and number of skin lesions among the groups. The Odds Ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) provide a measure of the strength of association, e.g. indicating the increase in odds of a given infected patient presenting skin cancer compared to the control population. All tests were conducted at the  $P=0.05$  level of significance.

### 3. Results

Clinical features of the different groups of patients and controls are presented in Table 1. Although skin cancer patients tended to be older than controls, all groups were statistically similar regarding sex, color and age. The graphic (Fig. 2) presents a comparison of HHV1 and HHV6 incidence among groups. Although HHV6 DNA sequences were detected in 30% of the patients with pathological cutaneous lesions (36/120) and in only 14.6% of skin tissues from the control population (6/41), the difference was not statistically significant (F;  $P=0.06$ ). However, the incidence of HHV6 positive individuals was higher in malignant skin cases (32/101=31.7%) than in the control individuals (F;  $P=0.0391$ ). On the other hand, HHV1 positive individuals were more frequent in both the skin lesion group (28/120=23.33%) and in patients with malignant tumors (24/101=23.8%), than in the control population (2/41=5%) (F;  $P=0.0094$  for skin lesions and  $P=0.0078$  for skin cancer).

The incidence of HHV6 was significantly higher in BCC (18/51=35.3%) than in control (17.1%) tissues (F;  $P=0.0320$ ). Although 4 out of the 9 MM cases were infected by HHV6, there was no statistical difference

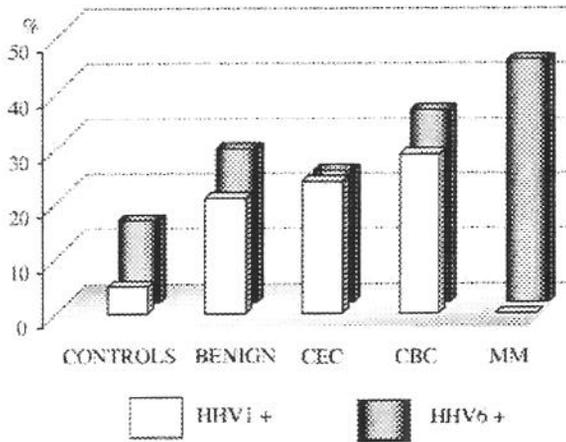


Fig. 2. Prevalence of HHV-1 and HHV-6 in skin lesions. Incidence of HHV-1 (white bars) and HHV-6 (black bars) presented as the percentage of infected individuals among the 41 subjects from the control population; 19 benign skin lesions; 41 squamous cell carcinomas (SCC); 51 basal cell carcinomas (BCC); and 9 malignant melanoma (MM) patients.

between HHV6 incidence in MM and control groups ( $F$ ;  $P=0.0652$ ). The incidence of HHV1 was significantly higher in both BCC (15/51 = 29.4%) and SCC (10/41 = 24.4%) groups, ( $F$ ;  $P=0.0027$  and  $P=0.0255$ ), respectively. No case of HHV1 infection was detected among the MM samples.

The risk of presenting BCC was more than 3 times higher for an HHV6 infected patient than for a non-infected individual (OR = 3.182; 95% CI: 1.125–8.997). The overall risk for skin cancer in individuals infected by HHV1 was increased more than 6 times (OR = 6.078; 95% CI: 1.365–27.061). HHV1 infected individuals were at risk of presenting BCC or SCC 8 times (OR = 8.125; 95% CI: 1.735–38.043) and 6 times (OR = 6.290; 95% CI: 1.283–30.850) higher than the non-infected individuals, respectively.

There was no difference between malignant and non-malignant pathologic skin conditions concerning HHV6 or HHV1 DNA detection. Also, HHV6 and HHV1 were present in the autologous normal skin samples but not in the corresponding tumor of 11/101 (10.9%) and 6/101 (6%) cases of skin lesions, respectively. This incidence was not different from the HHV6 and HHV1 incidence found in the normal skin samples.

Among the 25 skin cancer patients that were considered immunocompromised, 5 patients (20%)

had HHV6 and another 4 (16%) presented detectable HHV1 fragments. This incidence is not statistically different from those found in the immunocompetent patients and in the control population. In 2 of the immunocompromised patients HHV6 was present in both tumor and autologous tissues and in the other 3 cases it was detected only in the tumor sample. HHV1 was detected only in the tumoral tissue in 1 case and in both tumor and autologous tissues in the other 3 patients.

#### 4. Discussion

We were able to detect HHV6 and HHV1 DNA fragments in the DNA extracted from normal skin samples obtained from 14.6 and 5%, respectively, of the healthy control population from our region, a prevalence that is similar to the reported in other ethnic groups, using PCR-based-methods [19]. These rates indicate active infection, and are consistent with the more elevated rates obtained in seroepidemiologic surveys in Brazil [20,21].

The observation of Fig. 2 confirms an increasing HHV1 incidence rate from benign to SCC and BCC cases, with the notorious absence of HHV1 cases among the MM. Also, HHV6 incidence was higher among BCC (18/120, 15%). In fact, we found a threefold increased risk for BCC in HHV6 infected patients. The presence of HHV1 infection increased the susceptibility to BCC 8 times and to SCC 6 times. These results differ from Zafiroopoulos et al. that did not find any HHV1 fragment among the non-melanoma cancer samples obtained from Greek patients [22].

We were unable to demonstrate any significant difference between malignant and non-malignant pathologic skin conditions for HHV1 and HHV6 DNA detection. Also, we demonstrated the presence of both HHV6 and HHV1 in autologous normal tissue from patients with skin lesions and in normal control skin, suggesting that the skin may be one of the reservoirs for persistent infection in the adult. Indeed, HHV6 remains latent in monocytes and macrophages and probably in the salivary glands [23]. HHV6 may be reactivated in immunocompetent individuals during pregnancy or periods of critical illness requiring admission to intensive care units and has

been reported as a possible cause or cofactor of several malignancies [24–26]. There are also numerous reports of other possible disease associations involving HHV6 but, since HHV6 infection is ubiquitous and tissue tropism widespread, the detection of HHV6 DNA in a pathological condition may be a consequence of viral reactivation by a pathological condition rather than the etiological cause [27]. In vitro, HHV6 infection of transformed T-cell lines results in death by apoptosis and enhanced susceptibility to Fas-mediated apoptosis, an effect that occurs predominantly in uninfected cells [28]. This observation was supported by the demonstration that cells undergoing apoptosis had none of the cytologic characteristics of directly infected cells and that they did not stain positive with an anti-HHV6 antibody. In addition, apoptosis was induced by a virion-free supernatant of HHV6 infected cells [28]. Therefore, induction of apoptosis in uninfected cells may be one mechanism by which HHV6 induces immunosuppression. The combined effect of decreased IL-2 (interleukin 2) levels and enhanced susceptibility to apoptosis theoretically contributes to the clinical manifestation of HHV6 infections, including lymphopenia and immunosuppression [4]. Transformation to malignancy may also be facilitated by several factors induced or expressed by HHV6 infected cells. Tumor necrosis factor-alpha is overexpressed and this appears to induce HIV replication, which in turn increases HIV tat protein, a protein with oncogenic potential [12]. In both immunocompetent and immunosuppressed hosts, HHV6 produces an oncogenic protein called ORF-1 (open reading frame 1) that binds to wild-type p53 and inhibits regulation of the cell cycle [12].

HHV1 persists in a latent form for the life of its host, periodically reactivating. However, a definitive oncogenic potential has not been documented yet. In animal and in vitro tissue culture studies, HHV1 may participate in malignant transformation, chromosomal aberration/mutations and gene amplification in the presence of ultraviolet light and carcinogens, like nitrosamine and other tobacco extracts [12,29,30]. HHV1 binds and inactivates basic fibroblastic growth factor. It is the binding of this factor that may activate certain oncogenes [12,29,31]. The presence of HHV1 gene products in oral carcinomas has been documented; however, this

may simply represent reactivation of HHV1 infection due to the suppression of natural killer lymphocyte activity, which usually keeps HHV1 infection in check and in a latent phase [12,29,30]. There is also evidence that HHV1 participates as a cofactor in SCC development [12].

We have demonstrated a considerable incidence of HHV6 and HHV1 infection in skin cancer tissues that could be, in part, related to the higher age of patients in this group, since the frequency of antibody titers against HHV6 and HHV1 are higher in the aged population [32]. Other limitations of the present findings include our sample size and the non description of HHV1 patients with frequent recrudescence. Indeed, these patients may tend towards the production of T-helper 2 cytokines in response to the virus, which may lead, in turn, to less effective control of viral replication in the periphery following reactivation from latency. These patients may present non-specific reactivation of viruses in pathologic samples regardless of presence of malignancy [33]. On the other hand, HHV6 presence and, principally, HHV1 detection considerably increased the risk for skin cancer in infected individuals, suggesting that these viruses may play a role in susceptibility to skin malignancies, perhaps through reactivation of a latent infection. Although this observational study needs confirmation in biological models, it is tempting to suggest that HHV presence in the epithelial cells might contribute to the genomic instability, driving these cells to a cumulative multistep mutagenic process towards certain types of skin cancers [34].

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge Elaine C. Morari, Patricia L. Santarosa and Fabiana Granja for helpful discussion and critical reading of the manuscript. Also, we are grateful to Dr Sylvia Ypiranga for some of the samples and, especially, for the normal tissues collected for this study. We acknowledge Dr Aparecida Machado Moraes for provision of some of the patients initially included in our protocol.

## References

- [1] G. Klein, Perspectives in studies of human tumor viruses, *Front. Biosci.* 7 (2002) 268–274.
- [2] K.H. Vousden, P.J. Farrell, Viruses and human cancer, *Br. Med. Bull.* 50 (1994) 560–581.
- [3] J.S. Butel, Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease, *Carcinogenesis* 21 (2000) 405–426.
- [4] D.H. Dockrell, T.F. Smith, C.V. Paya, Human herpesvirus 6, *Mayo Clin. Proc.* 74 (1999) 163–170.
- [5] M.Y. Stoeckle, The spectrum of human herpesvirus 6 infection: from roseola infantum to adult disease, *Annu. Rev. Med.* 51 (2000) 423–430.
- [6] M. Howard, J.W. Sellors, D. Jang, N.J. Robinson, M. Fearon, J. Kaczorowski, M. Chernesky, Regional distribution of antibodies to herpes simplex virus type 1 (HHV1-1) and HHV1-2 in men and women in Ontario, Canada, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 84–89.
- [7] D. Siegel, E. Golden, A.E. Washington, S.A. Morse, M.T. Fullilove, J.A. Catania, et al., Prevalence and correlates of herpes simplex infections. The population-based AIDS in Multiethnic Neighborhoods Study, *J. Am. Med. Assoc.* 268 (1992) 1702–1708.
- [8] J. Levy, Three new herpesvirus (HHV6,7,8), *Lancet* 349 (1997) 558–562.
- [9] H. Kosuge, HHV-6, 7 and their related diseases, *Can. Commun. Dis. Rep.* 26 (2000) 1–27.
- [10] F. Drago, A. Rebora, The new herpesviruses, *Arch. Dermatol.* 135 (1999) 71–75.
- [11] C.M. Flaitz, M.J. Hicks, Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis, *Oral Oncol.* 34 (1998) 448–453.
- [12] P. Lusso, P. Secchiero, R.W. Crowley, A. Garzino-Demo, Z.N. Berneman, R.C. Gallo, CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: interference with human immunodeficiency virus, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91 (1994) 3872–3876.
- [13] D.E. Dwyer, A.L. Cunningham, Herpes simplex and varicella-zoster virus infections, *Med. J. Aust.* 177 (2002) 267–273.
- [14] A. Rotola, G. Gerna, D. Di Lica, A.R. Virgili, R. Manservigi, E. Cassai, Herpes simplex virus and human cancer. III. Search for relationship of herpes simplex antibodies and cervical dysplasia and labial neoplasia, *Tumori* 69 (1983) 83–87.
- [15] P.J. Abrahams, A.A. Van der Keij, R. Schouten, A.J. Van der Eb, Absence of induction of enhanced reactivation of Herpes Simplex Virus in cells from Xeroderma Pigmentosum patients without cancer, *Cancer Res.* 48 (1998) 6054–6057.
- [16] N.R. Telfer, G.B. Colver, P.W. Bowers, Guidelines for the management of basal cell carcinoma, *Br. J. Dermatol.* 141 (1999) 415–423.
- [17] R. Motley, P. Kersey, C. Lawrence, Multi-professional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma, *Br. J. Dermatol.* 146 (2002) 18–25.
- [18] J.A. Newton-Bishop, P.G. Corrie, J. Evans, M.E. Gore, P.N. Hall, N. Kirkham, et al., UK guidelines for the management of cutaneous melanoma, *Br. J. Plast. Surg.* 55 (2002) 46–54.
- [19] P. Secchiero, D.R. Carrigan, Y. Asano, L. Benedetti, R.W. Crowley, A.L. Komaroff, et al., Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 273–280.
- [20] D.R. Carrigan, Human herpesvirus-6 and bone marrow transplantation, *Blood* 85 (1995) 294–295.
- [21] J. Rajcani, R. Yanagihara, M.S. Godec, J.W. Nagle, M. Kudelova, D.M. Asher, Low-incidence latent infection with variant B or roseola type human herpesvirus 6 in leukocytes of healthy adults, *Arch. Virol.* 134 (1994) 357–368.
- [22] A. Zafiroopoulos, E. Tsentelierou, K. Billiri, D.A. Spandidos, Human herpes viruses in non-melanoma skin cancers, *Cancer Lett.* 198 (2003) 77–81.
- [23] R.W. Cone, M.I. Huang, R. Ashley, L. Corey, Human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood cells and saliva from immunocompetent individuals, *J. Clin. Microbiol.* 31 (1993) 1262–1267.
- [24] A. Simoes-Barbosa, G.F. Coutinho, J.X. da Silva, L.R. Leal, W.P.T. Barbosa, Six-year follow-up survey of sexually transmitted diseases in Brasilia, the Capital of Brazil, *Braz. J. Infect. Dis.* 6 (2002) 110–118.
- [25] S.A. Adad, R.V. De Lima, Z.T. Sawan, M.L. Silva, M.A. De Souza, J.C. Saldanha, et al., Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida Sp* and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades, *Sao Paulo Med. J.* 119 (2001) 200–205.
- [26] D.H. Dockrell, C.V. Paya, Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation, *Rev. Med. Virol.* 11 (2001) 23–36.
- [27] H. Dahl, G. Fjaertoft, T. Norsted, F.Z. Wang, M. Mousavi-Jazi, A. Linde, Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy, *J. Infect. Dis.* 180 (1999) 2035–2038.
- [28] R.R. Razonable, C. Fanning, R.A. Brown, M.J. Espy, A. Rivero, J. Wilson, et al., Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant A occurs in critically ill immunocompetent hosts, *J. Infect. Dis.* 185 (2002) 110–113.
- [29] D.H. Dockrell, Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features, *J. Med. Microbiol.* 52 (2003) 5–18.
- [30] Y. Inoue, M. Yasukawa, S. Fujita, Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6, *J. Virol.* 71 (1997) 3751–3759.
- [31] C. Scully, Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous cell carcinoma, *J. Oral Pathol. Med.* 22 (1993) 337–347.
- [32] P.D. Griffiths, Herpesviruses and AIDS, *Scan. J. Infect. Dis.* 100 (1996) 3–7.
- [33] D.B. McKenna, W.A. Neill, M. Norval, Herpes simplex virus-specific immune responses in subjects with frequent and infrequent orofacial recrudescences, *Br. J. Dermatol.* 144 (2001) 459–464.
- [34] C. Scully, Oral cancer: new insights into pathogenesis, *Dental Update* 20 (1993) 95–100.

## ORIGINAL ARTICLE

# Polymorphisms at exon 4 of *p53* and the susceptibility to herpesvirus types 6 and 1 infection in renal transplant recipients

Janaína L. Leite,<sup>1</sup> Juliana A. Manfrinatto,<sup>2</sup> Marilda Mazzali<sup>2</sup> and Laura S. Ward<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medicine, Laboratory of Cancer Molecular Genetics, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Department of Medicine, Division of Nephrology, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

## Keywords

codon 47, codon 72, herpesvirus, *p53* gene, renal transplant recipients.

## Correspondence

Laura S. Ward MD, PhD, Laboratory of Cancer Molecular Genetics, 126 Tessalia Vieira de Camargo, 13084-970 Campinas, São Paulo, Brazil. Tel./fax: 55 19 3289 7878, e-mail: ward@unicamp.br

Received: 22 February 2006

Revision requested: 21 March 2006

Accepted: 28 April 2006

doi:10.1111/j.1432-2277.2006.00346.x

## Summary

In order to replicate their own genome in the host nucleus, herpesviruses have to overcome the barrier presented by *p53* gene. Variants of codon 72 and codon 47 of exon four decrease the ability of *p53* to induce apoptosis. In order to investigate the influence of this germline inheritance on the susceptibility to herpesvirus type 6 (HHV6) and 1 (HHV1) infection, we examined 78 renal transplant recipients and 151 controls. HHV6 infection was more frequent among the renal transplant patients (35.89%) than in the control population (11.25%) ( $P < 0.001$ ). HHV1 infection rate was similar in renal transplant patients (7.28%) and controls (2.56%). HHV6-positive cases were more frequent among patients with codon 72 of *p53* variants (60.71%) than among wild-type *p53* patients (28.20%) ( $P = 0.001$ ) despite the higher frequency of codon 72 of *p53* wild-type variant in renal transplant patients compared with controls (64.1% vs. 36.4%;  $P < 0.001$ ). The presence of a codon 72 of *p53* germline variant genotype increased the risk for HHV6 infection more than five times (OR = 5.479; 95% CI = 1.992–15.069). Our data suggest that codon 72 of *p53* polymorphism genotyping may be useful to screen for patients at higher risk for post-transplant infections hence identifying individuals that could benefit from preventive treatment.

## Introduction

Renal transplant recipients are at an increased risk for developing many viral infections. As herpesviruses are widely distributed among human populations and persist in the host following primary infection, most transplant recipients will probably harbor multiple latent viruses. The immunosuppressive state post-transplant favors viral reactivation. In addition, patients that have escaped infection up to the time of transplant face the risk of acquiring cytomegalovirus or other herpesviruses from the donor organ or from blood products when receiving immunosuppressive agents to prevent or treat rejection [1]. These viral infections may be severe and threaten the outcome of the transplant recipients.

Cellular signaling plays a major role in different aspects of virus infection and pathogenesis [2,3]. Herpesviruses, like every infectious agent that requires the replication of its own genome in the host nucleus, have to overcome the barrier presented by *p53* tumor suppressor gene. Normal (wild-type) *p53* maintains the integrity of the genome by causing a pause in the cell cycle until damage has been repaired or by inducing apoptosis in cells posing a risk to the organism [4]. Both herpesvirus type 6 (HHV6) and herpesvirus type 1 (HHV1) have been shown to induce programmed cell death [5–7].

A critical region of *p53* for signaling apoptosis lies between codons 64 and 92, encoding a proline-rich region of the gene in which there is a common polymorphism resulting in either an arginine or a proline at codon 72 of

exon 4. Proline polymorphic alleles (P72) have a markedly poorer ability to induce apoptosis than arginine variants [4]. One source of this inferior apoptotic potential is the poorer ability of the proline variant to localize to the mitochondria [8]. The interaction of p53 with the proapoptotic mitochondrial membrane protein Bak and the consequent release of cytochrome c into cytosol are impaired [9]. More recently, another polymorphism site, at codon 47 of the same exon 4 of p53, was also demonstrated to significantly decrease p53 ability to induce apoptosis [10]. Codon 47 encodes proline in wild-type p53, but in a small subset of individuals it can encode serine (CCG-TCG) [10]. The serine 47 (S47) polymorphic variant, which replaces the proline residue necessary for recognition by proline-directed kinases, is a markedly poorer substrate for phosphorylation on serine 46 by p38 MAPK [10]. S47 was described to occur in *cis* with P72, suggesting both polymorphisms are linked [10].

We have recently demonstrated that HHV6 and HHV1 are associated with the risk for basal cell carcinomas and suggested that these viruses may play a role in the susceptibility to skin malignancies, perhaps through reactivation of a latent infection [11]. Unfortunately, the small number of immunocompromised subjects in this first study prevented any further insight into the role of their immunologic state. Deciphering cellular signaling, which is crucial for reactivation, may help us better understand herpesviruses pathogenesis. Hence, the present study was designed to investigate the influence of codon 72 and codon 47 of p53 on the susceptibility to HHV6 and HHV1 infection in immunosuppressed patients.

## Materials and methods

### Subjects

The study was approved by the Research Ethics Committee of the University Hospital-School of Medicine of the State University of Campinas-São Paulo, and informed written consent was obtained from all individuals. The group of patients consisted of 78 kidney transplant recipients under standard maintenance immunosuppressive therapy that included azathioprine, cyclosporine, and prednisone (55%); mophetil mycophenolate, prednisone, and cyclosporine (24.2%) and tacrolimus, MMF, and prednisone (20.8%). They were consecutively recruited from patients transplanted from 06/2003 to 02/2005 that were under regular follow-up care at the renal transplantation outpatients' clinics. None of the patients presented unusual complications or any malignancy by the time of blood sample collection. A control group of 151 healthy individuals was selected from the general population of our region. Data on ethnic background, dietary habits

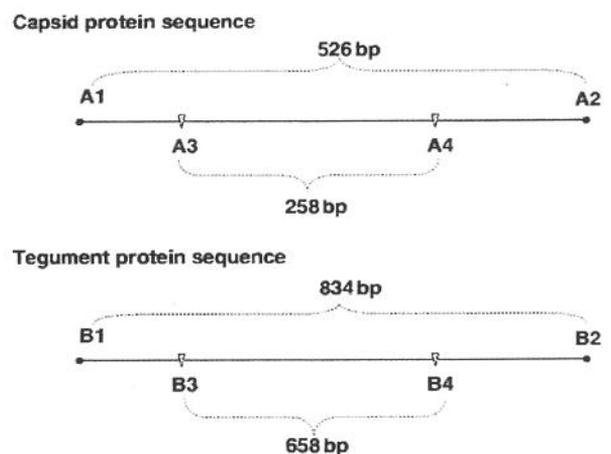
and lifestyle, as well as age and sex, were considered in order to obtain a control group similar to the patients group. Patients and controls were classified into whites and nonwhites.

### Methods

Blood specimens were obtained from all 229 subjects included in the study. HHV and genotyping were performed in blood withdrawn between 6 and 12 months after transplantation. DNA was extracted using a standard proteinase-K and phenol-chloroform protocol.

### HHV6 and HHV1 identification

Herpesvirus type 1 and HHV6 were identified using previously described methods [11]. In summary, HHV1 sequences were obtained by polymerase chain reaction (PCR) using one set of primers that amplified a target sequence of 199 bp. In order to amplify HHV6 sequences, we used two sets of nested primers as schematically demonstrated in Fig. 1. The first set was designed to amplify a highly conserved sequence corresponding to the major capsid protein gene. It consisted of an outer pair of primers, A1 and A2, and an inner pair of primers, A3 and A4. Primers A1 and A2 defined a target sequence of 526 bp, whereas A3 and A4 amplified a 258-bp fragment. The second set of primers was designed to amplify the region shown to encode a putative large tegument protein, and consisted of an outer pair of primers, B1 and B2, and an inner pair, B3 and B4. Primers B1 and B2 defined a target sequence of 834 bp, while primers B3 and B4 amplified a 658-bp fragment. Positive HHV1 and HHV6 controls were obtained from patients with active clinical infection and positive serological tests.



**Figure 1** Schematic representation of the sets of primers used to detect herpesvirus type 6.

*Determination of codon 72 of p53 polymorphism*

For the identification of the polymorphism at codon 72 of the p53 gene, we used an allele-specific PCR reaction with two sets of primers, one to amplify the Arg allele and the other to amplify the Pro allele, as previously described [12].

*Determination of codon 47 of p53 polymorphism*

For the identification of the polymorphism at codon 47 of the p53 gene, we used a PCR-RFLP assay with primers (5' CACCCATCTACAGTCCCCC/5' ACCGTAGCTGC CCTGGTAG3') that amplified a fragment of 241 bp. The PCR was performed in 25 µl volumes of a mixture containing 100 ng DNA, 10 µM of each primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM of each dinucleotide triphosphate, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 U Taq DNA polymerase. Amplifications were carried out for 35 cycles of 94 °C for 30 s, annealing temperatures 60.5 °C for 50 s and 72 °C for 1 min, with an initial denaturation step of 94 °C for 5 min and a final extension step of 72 °C for 10 min using an MJ PTC-200 PCR system thermocycler. PCR products were digested with *bcnI* (*CauII*) and analyzed on a 3.0% agarose gel.

Six samples from each assay were directly sequenced and confirmed to be the PCR-predicted variants. Positive and negative control samples were included in all PCR and RFLP runs to detect possible contamination problems, gel loading, and typing inconsistencies.

*Statistical analysis*

Statistical analysis was conducted using SAS (Statistical Analysis System, version 8.1, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA, 1999–2000). Associations were assessed using 2 × 2 or 2 × n contingency table analysis and chi-squared or Fisher's exact tests were used to examine homogeneity between cases and controls regarding gender, color, viral infection, and genotypes. Kruskal-Wallis test was used to compare age among the different groups. The odds ratio and 95% CI provide a measure of the strength of association, e.g. indicating the increase in odds of a given genotype patient presenting a viral infection compared with the control population. All tests were conducted at the P = 0.05 level of significance.

**Results**

Both patients and controls groups were statistically similar regarding sex (31 males and 47 females vs. 66 males and 85 females), age (42.76 ± 12.86 vs. 38.87 ± 14.85 years old), and color (71 whites and seven nonwhites vs. 132 whites and 19 nonwhites), demographic and lifestyle characteristics, including alcohol consumption, cigarette smoking, dietary habits, education and exercise, UV, and possible chemicals exposure.

**Table 1.** Codons 72 and 47 of exon 4 of p53 genotypes distribution among the control individuals and renal transplant patients.

Codon	Genotypes	Controls, n (%)	Renal transplant, n (%)	P
Codon 72	Arg/Arg	55 (36.42)	50 (64.1)	<0.0001
	Arg/Pro	94 (62.25)	26 (33.33)	<0.0001
	Pro/Pro	2 (1.32)	2 (2.56)	0.2194
Codon 47	Pro/Pro	106 (70.19)	61 (78.2)	0.2130
	Pro/Ser	45 (29.8)	17 (21.79)	0.2130
	Ser/Ser	0	0	
Codon 72 + 47	Variants	30 (19.86)	6 (7.69)	0.0206
Total of cases		151	78	

Table 1 summarizes data of the overall proportions of the p53 codon 72 and codon 47 genotypes in the control population and in the renal transplant patients. Genotypes were not in Hardy-Weinberg equilibrium neither in the patients nor in the control group. Renal transplant patients showed an increased frequency of the wild-type Arg/Arg variant of codon 72 of p53 (64.1%) in comparison with the control population (36.4%) (F; P < 0.001). Codon 47 of p53 wild-type Pro/Pro variant appeared in similar proportions in the renal transplant population (78.2%) and the controls (70.19%). S47 occurred in 45 whites and 17 nonwhites individuals. Only 36 (29.03%) out of the 124 individuals presenting P72 variants also had S47 variant. The number of individuals presenting the combined P72 and S47 variants was higher in the control group (19.86%) than in the renal transplant patients (7.69%) (F; P = 0.0206).

Herpesvirus type 6 and HHV1 infections were detected in 28 and two transplant patients, respectively, as demonstrated in Table 2. HHV6 infection was more frequent among the renal transplant patients (35.89%) than in the control population (11.25%) (F; P < 0.0001), but there was no difference in the incidence of HHV6 positivity among the sub-groups of patients treated with different immunosuppressive drugs. There was no statistical difference between the prevalence of HHV1 infection among the control population (7.28%) and the renal transplant patients (2.56%).

There was no difference in the number of HHV6 or HHV1 infected patients between S47 and wild-type codon 47 of p53 cases. Also, HHV1 infection rate was similar in individuals with P72 and wild-type codon 72 of p53 genotype cases. However, HHV6 positive cases were more frequent among renal transplant patients with P72 variants (17 out of the 28 HHV6 positive cases = 60.71%) than in patients presenting the wild-type Arg/Arg genotype (11 out of the 50 cases = 22%) (F; P = 0.001). In fact, the presence of a germline P72 genotype increased

**Table 2.** Estimates of relative risk for herpes virus type 6 (HHV6) and type 1 (HHV1) infection associated with exon 4 of p53 genotypes.

Genotypes	Controls		Renal transplant		OR (CI)	P HHV6	OR (CI)	P HHV1
	HHV6	HHV1	HHV6	HHV1				
Codon 72								
ARG/ARG	5	2	11	2	1*	–	1*	–
ARG/PRO	12	9	15	0	4.835 (1.732–13.494)	0.004	0.366 (0.016–7.915)	0.543
PRO/PRO	0	0	2	0	17.174 (0.768–384.03)	0.058	3.880 (0.144–104.41)	1.000
P72 variants	12	9	17	0	5.479 (1.992–15.069)	0.001	0.340 (0.015–7.348)	0.533
Codon 47								
PRO/PRO	15	9	22	2	1*	–	1*	–
PRO/SER	2	2	6	0	0.966 (0.314–2.975)	1.000	0.680 (0.031–14.848)	1.000
SER/SER	0	0	0	0	–	–	–	–
S47 variants	2	2	6	0	0.966 (0.314–2.975)	1.000	0.680 (0.031–14.848)	1.000

\*Used as the reference group.

the risk for HHV 6 infection more than five times (OR = 5.479; 95% CI = 1.992–15.069).

## Discussion

More effective immunosuppressive therapies have been steadily decreasing the rate of acute rejection after renal transplantation. Unfortunately, more aggressive immunosuppression exposes the renal transplant recipient to more frequent infectious complications. Detectable reactivations of HHV6 occur in one-third to two-thirds of all transplant [13]. We found 35.89% of our renal transplant patients to be infected with HHV6, a rate very similar to most reports on the incidence of post-transplant HHV6 infection in solid organ transplants [14]. Likewise, in the majority of patients seropositive for herpes simplex virus (HSV)-1 or -2, virus replication occurs after transplantation, although only a minority of patients develops symptoms [13]. The clinical significance of reactivation of these viruses in renal transplant recipients is still not clear, but they certainly may represent a serious threat to the immunosuppressed transplant recipient. Infection with HHV6 induces marked immunodepression, may be a co-factor of HIV progression, and an association with cytomegalovirus disease and with fungal infection in transplant recipients has also been reported [15–17]. Prior to the onset of antiherpetic drug prophylaxis, recurrent HSV1 or HSV2 infections accounted for as much as 70–80% of severe mucocutaneous diseases in allogenic bone marrow or blood progenitor cell transplant recipients and affected a similar number of solid organ transplant recipients [17–19].

The p53 gene plays a critical role in cell cycle control, facilitating DNA repair activities and protecting against DNA damages [20]. Every infectious agent that requires the replication of its own genome in the host nucleus has

to overcome the barrier presented by p53. Alterations in the level, function, and localization of p53 caused by herpesviruses have been reported in various studies and it has been suggested that herpesviruses require the recruitment of p53 in order to replicate [21–23]. Also, HHV6 was shown to induce apoptosis [24–26].

The ability of p53 to induce apoptosis is significantly reduced by two polymorphisms, at codons 47 and 72 of exon 4 [10]. We found a higher prevalence of HHV6 infection among individuals with the less effective P72 alleles, suggesting that HHV6 infection is facilitated by the presence of codon 72 polymorphism. Arresting cells, rather than destroying them, may be an evolutionary-developed advantage for HHV6. Indeed, hiding from the immune system and keeping infected cells alive may prevent the immune reactions initiated by the liberation of viral proteins from apoptotic cells. Hence, infection of cells that are less able to undergo apoptosis may favor HHV6 survival. Recent *in vitro* experiments suggest that HHV6 has a mechanism to retain p53 within the cytoplasm that protects the infected cells from apoptosis, corroborating previous reports of alterations in the level, function, and localization of p53 produced by herpesviruses [27].

We were not able to identify a higher risk of viral infection among individuals with the S47 polymorphism, perhaps because of the relatively small number of patients with this polymorphism. There is very little data on S47 polymorphism. It was described in <5% of African-Americans and in none of the 69 Caucasians included in a first prevalence report [28]. More recently, genotyping 200 African-Americans, Li identified an even lower prevalence of S47 variant in only 1% of the subjects and found the S47 allele in *cis* with the proline 72 polymorphism (P72) suggesting that S47 and P72 were linked [10]. Our data indicate a much higher prevalence of 27.07% of the S47

variant among the Brazilian population. Furthermore, only 29% occurred in *cis* with P72, contradicting the previous reports. Because our population presents a highly heterogeneous ethnic background, we classified our subjects in white and nonwhite. The ethnic mixture of our population composed of people with different heritages and relatively recent immigration flows, besides the relatively small number of individuals we studied, may have contributed to the observed lack of Hardy-Weinberg genotypic equilibrium. The fact that the majority of the individuals with S47 were white suggests that broader studies, including a larger number of Caucasians, are needed to establish the real prevalence of S47.

In conclusion, we demonstrated that the germline inheritance of P72 increases the risk for HHV6 infection. Hence, a simple genotyping procedure using a peripheral blood sample may help identify transplant recipients that could benefit from preventive treatment in a disease and infection management program for transplant patients [29].

### Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPESP 03/02309-7 and 03/07881-0 and from CNPQ 305775/2004-9.

### References

1. Pass R. Herpesvirus infections in transplant recipients. *Herpes* 2000; 7: 3.
2. Shackelford J, Pagano JS. Tumor viruses and cell signaling pathways: deubiquitination versus ubiquitination. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 5089.
3. Whitman AG, Hamden KE, Ford PW, McCubrey JA, Akula SM. Role for Raf in the entry of viruses associated with AIDS. *Int J Oncol* 2004; 25: 469.
4. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 2002; 358: 15.
5. Yasukawa M, Inoue Y, Ohminami H, Terada K, Fujita S. Apoptosis of CD4+ T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection. *J Gen Virol* 1998; 79: 143.
6. Secchiero P, Flamand L, Gibellini D, et al. Human herpesvirus 7 induces CD4(+) T-cell death by two distinct mechanisms: necrotic lysis in productively infected cells and apoptosis in uninfected or nonproductively infected cells. *Blood* 1997; 90: 4502.
7. Winkler MT, Doster A, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J Virol* 1999; 73: 8657.
8. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 443.
9. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003; 33: 357.
10. Li X, Dumont P, Della Pietra A, Shetler C, Murphy ME. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *Biol Chem* 2005; 280: 24245.
11. Leite JL, Stolf HO, Reis NA, Ward LS. Human herpesvirus type 6 and type 1 infection increases susceptibility to nonmelanoma skin tumors. *Cancer Lett* 2005; 224: 213.
12. Granja F, Morari J, Morari EC, Correia LA, Assumpção LVM, Ward LS. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 2004; 210: 151.
13. Smith SR, Butterly DW, Alexander BD, Greenberg A. Viral infections after transplantation. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 659.
14. Ketteler M, Kunter U, Floege J. An update on herpes virus infections in graft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 1703.
15. Gentile G. Post-transplant HHV-6 diseases. *Herpes* 2000; 7: 24.
16. Yoshikawa T. Human herpesvirus-6 and -7 infections in transplantation. *Pediatr Transplant* 2003; 7: 11.
17. Meyers JD, Wade JC, Mitchell CD, et al. Multicenter collaborative trial of intravenous acyclovir for treatment of mucocutaneous herpes simplex virus infection in the immunocompromised host. *Am J Med* 1982; 73: 229.
18. Jenkins FJ, Rowe DT, Rinaldo Jr CR. Herpesvirus infections in organ transplant recipients. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; 10: 1.
19. Cleaver JE. Mechanisms by which human cells bypass damaged bases during DNA replication after ultraviolet irradiation. *Sci World J* 2002; 14: 1296.
20. Robles AI, Harris CC. p53-mediated apoptosis and genomic instability diseases. *Acta Oncol* 2001; 40: 696.
21. Takemoto M, Mori Y, Ueda K, Kondo K, Yamanishi K. Productive human herpesvirus 6 infection causes aberrant accumulation of p53 and prevents apoptosis. *J Gen Virol* 2004; 85: 869.
22. Flaitz CM, Hicks MJ. Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis. *Oral Oncol* 1998; 34: 448.
23. Muralidhar S, Doniger J, Mendelson E, et al. Human cytomegalovirus MTRII oncoprotein binds to p53 and down-regulates p53-activated transcription. *J Virol* 1996; 70: 8691.
24. Ichimi R, Jin-No T, Ito M. Induction of apoptosis in cord blood lymphocytes by HHV-6. *J Med Virol* 1999; 58: 63.
25. Inoue Y, Yasukawa M, Fujita S. Induction of T-cell apoptosis by human herpesvirus 6. *J Virol* 1997; 71: 3751.
26. Yasukawa M, Inoue Y, Ohminami H, Terada K, Fujita S. Apoptosis of CD4 T lymphocytes in human herpesvirus-6 infection. *J Gen Virol* 1998; 79: 143.

27. Takemoto M, Shimamoto T, Isegawa Y, Yamanishi K. The R3 region, one of three major repetitive regions of human herpesvirus 6, is a strong enhancer of immediate-early gene U95. *J Virol* 2001; 75: 10149.
28. Felley-Bosco E, Weston A, Cawley HM, Bennett WP, Harris CC. Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 752.
29. Marty FM, Rubin RH. The prevention of infection post-transplant: the role of prophylaxis, preemptive and empiric therapy. *Transpl Int* 2006; 19: 2.

## Influence of the glutathione s-transferase gene polymorphisms on the susceptibility to basal cell skin carcinoma

Janaína L Leite, Elaine C Morari, Fabiana Granja, Gabriela M Campos, Ana CT Guilhen, Laura S. Ward.

**Background:** The identification of groups at high risk is fundamental to determine preventive strategies for skin cancer. Destructive reactive oxygen species produced by UVA or chemical carcinogens are metabolized by a series of enzymes. Polymorphisms of genes encoding for these enzymes may produce defective proteins with a diminished ability to detoxify a wide range of carcinogens. **Aims:** To ascertain the influence and potential interactions of several polymorphisms of genes encoding four important antioxidant GST enzymes in the susceptibility to cancer among Brazilians. **Material and methods:** We compared the genotypes of Glutathione S-Transferase mu, theta, pi and omega (GSTM1, GSTT1, GSTP1 and GSTO2) in a group of 102 patients with skin lesions and 124 controls. **Results:** Patients with Basal Cell Skin Carcinoma (BCC) presented the combined GSTM1-GSTT1+ genotype more frequently (49.1%) than controls (29.8%) (Fisher test;  $p=0.04$ ), conferring a 2.273 (Odds Ratio; 95% CI =1.199-4.308) higher risk for BCC. We were not able to find any other association between genotypes or between any genotype and the patients' clinical features. **Conclusions:** The GST profile may help identify Brazilian individuals at higher risk for BCC (Rev Méd Chile 2007; 135: 301-6).

**(Key words:** Carcinoma, basal cell; Glutathione S-transferase; Polymorphism, genetic)

Recibido el 8 de junio, 2006. Aceptado el 29 de agosto, 2006.

Financial support: This work was supported by grants from FAPESP 03/02309-7 and 03/07881-0 and from CNPQ 305775/2004-9.

Laboratory of Cancer Molecular Genetics, Department of Medicine, School of Medicine, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

## Influencia de polimorfismos de genes de glutathione s-transferasa en la susceptibilidad a carcinoma cutáneo de células basales

**Antecedentes:** La identificación de grupos en riesgo elevado es fundamental en la determinación de las estrategias preventivas para el cáncer de la piel, el maligno humano más común. Las especies reactivas destructivas del oxígeno producidas por UVA o los agentes carcinógenos químicos son metabolizadas por una serie de enzimas. Los polimorfismos de los genes que codifican para estas enzimas pueden producir las enzimas defectuosas con una

Corresponding Author: Laura S. Ward, MD, PhD. Laboratory of Cancer Molecular Genetics FCM - UNICAMP. Tessalia Vieira de Camargo 126 13081-970, Campinas, São Paulo, Brazil. Phone/Fax: 55 19 3289 4107. E mail: ward@unicamp.br

capacidad disminuida de desintoxicar una amplia gama de agentes carcinógenos. **Objetivo:** Este estudio fue diseñado para comprobar las interacciones de la influencia y del potencial de varios polimorfismos de los genes que codificaban 4 enzimas importantes del antioxidante GST en la susceptibilidad al cáncer entre brasileños. **Métodos:** Comparamos los genotipos del mu del S-Transferase del Glutathione, de la theta, de pi y de Omega (GSTM1, GSTT1, GSTP1 y GSTO2) en un grupo de 102 lesiones de piel y de 124 controles. **Resultados:** Los pacientes con el carcinoma basocelular (BCC) presentaron el genotipo combinado de GSTM1-GSTT1+ más frecuente (49,1%) que los controles (29,8%) (Fisher test;  $p = 0,04$ ), confiriendo 2.273 (Odds Ratio 95% CI = 1.199-4.308) un riesgo más alto para BCC. No encontramos ninguna otra asociación entre los genotipos o entre ningún genotipo y características clínicas de los pacientes. **Conclusiones:** Sugerimos que el perfil de GST pueda ayudar a identificar a individuos brasileños en un riesgo más alto para BCC.

Cancer of the skin is the most common malignancy in human beings. More than one million cases occur every year and the worldwide raise in this incidence to near epidemic proportions has led to increased morbidity and appreciating costs in many countries<sup>1</sup>. Variations of skin cancer incidence in different geographic and ethnic groups suggest that environmental factors have a strong influence in the skin tumorigenic process. In fact, there are compelling clinical, epidemiological and experimental evidences of environmental risk factors including ultraviolet (UVR) and ionizing radiations, cell-transforming viruses, immunosuppression and an increasing list of chemical carcinogens<sup>1</sup>. However, humans vary greatly in their likelihood of developing cancer in response to the natural hazards that they are constantly exposed to. Individual differences in susceptibility to carcinogens play an essential role in the development of sporadic tumors. The biochemical basis for this susceptibility is related to genetic polymorphisms that normally occur in the general population regarding genes involved in predisposition to a specific cancer, in the metabolic activation or detoxification of environmental genotoxins, and in controlling DNA repair or cellular damage<sup>2-4</sup>. Among the several polymorphic genes encoding for enzymes involved in free radical metabolism and biotransformation of carcinogens that have been investigated as possible cancer risk modifiers, the glutathione S-transferase gene system (GST) is one of the most well-known<sup>4,5</sup>. It consists of a large multigenic group of detoxifying enzymes whose activity, catalyzing the conjugation of toxic and mutagenic compounds with glutathione, is essential for cell protection<sup>5,6</sup>. Four classes of isoenzymes have been related to human malignancy: mu (GSTM),

pi (GSTP), omega (GSTO) and theta (GSTT). Several studies, including our own, have shown that individuals who are deletion homozygote for GSTM1 or GSTT1, as well as individuals that present GSTP1 variants (GSTv) resulting from an aminoacid substitution (1105Valine) at exon 5 of GSTP1, are at increased risk for a series of tumors<sup>2-4,7,8</sup>. GST enzymes are implicated in the detoxification of lipid and DNA products of UVR-derived oxidative stress and allelic variants at GSTs are associated with outcome of various oxidative-stress related diseases, including skin cancer<sup>9-13</sup>.

More recently, genetic polymorphisms of GSTO gene were described including GSTO2 N142D, a variant at base 424<sup>14</sup>. These polymorphisms have been related to a lower capacity of the corresponding enzymes to metabolize arsenic, a well-known skin carcinogenic chemical<sup>14,15</sup>.

The genetic profiles of each population, its occupational pattern, alimentary and social characteristics are fundamental in determining the susceptibility to some tumors. In addition, a balance between several antioxidant enzymes may be more important than the activity of a single enzyme alone for the overall protective capacity against free radical-mediated damage, and deficiencies of one gene may be partially compensated for by other related genes, stressing the importance of determining the genetic profile of specific populations. Brazilian population is particularly interesting due to its highly heterogeneous background and racial admixture, and data on the influence of its genetics on skin cancer susceptibility are still scarce.

Hence, the present case-control prospective study was designed to ascertain the influence and potential interactions of genes encoding 4 important antioxidant GST enzymes in the susceptibility to cancer among Brazilians.

PATIENTS AND METHODS

The study was approved by the Ethics Committees of the University Hospital-School of Medicine of the State University of Campinas (HC-FCM/UNICAMP), and informed written consent was obtained from all individuals.

One hundred and two unrelated adult patients consecutively referred for skin lesion evaluation, that agreed to participate, were enrolled in the study. The study population was composed of 29 squamous cell carcinomas (SCC), 59 basal cell carcinoma (BCC), 5 malignant melanomas (MM) and 9 non-malignant lesions (benign). All patients were carefully examined and previous medical conditions were particularly considered, especially organ transplantation, immunosuppressive therapy, other malignancies and HIV infection.

A control group of 124 healthy blood donors individuals (61 males and 63 females, 36 to 96 years old, 64.12±19.34 years old) was selected from the general population of our region through HC/FCM/UNICAMP. Because of the high ethnic mixture and heterogeneity of the Brazilian population, all individuals were classified into whites (or Euro-Brazilians) and non-whites in accordance with the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2003). Data on UV and possible chemicals exposure, ethnic background as well as age and sex were considered in order to obtain a control group similar to the patients group. All individuals lived in urban areas. Individuals suspected of any immunosuppressive condition or to have been recurrently exposed to any chemicals were excluded.

Blood specimens were obtained from all patients and control individuals simultaneously with tissues samples from patients with lesions. Genomic DNA was extracted from frozen specimens and leukocytes separated from whole blood using a standard proteinase-K-phenol-chloroform protocol. A multiplex-Polymerase Chain Reaction (PCR) assay was used to simultaneously amplify the GSTT1 and GSTM1 genes as previously described<sup>8</sup>. GSTP1 and GSTO2 variants were studied using PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) assays. For GSTP1, the PCR was performed in 25 µl volumes of a mixture containing 100 ng DNA, 10 µM of each primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM of each dinucleotide triphosphate, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 U Taq DNA

polymerase. Amplifications were carried out for 35 cycles of 94°C for 45 seconds, annealing temperatures 62.4°C for 45 seconds and 72°C for 1 min, with an initial denaturation step of 94°C for 5 min and a final extension step of 72°C for 7 min using a Thermocycler MJPTC-200 PCR System. The pair of primers for GSTP1 (5' CCAGGCTGGGGCTCACACACAGC3'/5'GGTCAGCCCAAGCCACCTGAGG3') amplified a fragment of 306bp. For GSTO2, we used the same conditions as above with annealing temperature of 62°C. The pair of primers for GSTO2 (5'ACTGAGAACCGGAACCA-CAG3'/5'GTACCTCTTCCAGGTTG3') amplified a fragment of 280bp. RFLP was carried out using Alw26I (BsmAI) and MboI enzymes for GSTP1 and GSTO2 assays respectively, according to the manufacturer's protocol (Fermentas Life Sciences). The fragments were analyzed after electrophoresis on a 3.0% agarose gel. Six samples from each assay were directly sequenced and confirmed to be the PCR predicted variants. Positive and negative control samples were included in all PCR and RFLP runs to detect possible contamination problems, gel loading and typing inconsistencies.

Statistical analysis was conducted using SAS (Statistical Analysis System, version 8.1, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA, 1999-2000). Associations were assessed using 2X2 or 2Xn contingency table analysis and Chi-square ( $\chi^2$ ) or Fisher's (F) exact tests were used where appropriate. Kruskal-Wallis (KW) test was used to compare age among groups. Mann-Whitney or Wilcoxon tests were used to compare age among different genotype groups. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were used to analyze the frequency of phenotypes since they provide a measure of the strength of association, compared to the control population. All tests were conducted at the p =0.05 level of significance.

RESULTS

The clinical features of the control individuals and the skin lesion patients are summarized in Table 1 where we also present the overall genotyping profile of the studied groups. There were no differences between the control and the skin disease patients regarding gender (61 males and 63 females versus 53 males and 49 females), age (64.12±19.34 years versus 64.11±15.64) and eth-

**Table 1.** Distribution of the control individuals and patients. This distribution is according to their skin lesions' histology, clinical features including age ( $X \pm SD$  in years), gender (F: female; M: male), ethnicity (W: white, NW: non-white), and the corresponding genotype for GSTM1, GSTT1, GSTP1 and GSTO2. Genotypes are represented as + (present) or - (absent) according to the presence of the allele or WT, HET and HO according to the presence of a wild type, a heterozygous or a homozygous variant form of the gene, respectively

Histology	Clinical characteristics					Genotype									
	Age ( $\bar{x} \pm SD$ )	Sex		Ethnicity		GSTM1		GSTT1		GSTP1			GSTO2		
		M	F	W	NW	+	-	+	-	WT	HET	HO	WT	HET	HO
Controls (N =124)	64.12±19.34	61	63	98	26	72	52	96	28	60	46	18	40	62	22
Non-malignant (N =9)	61.66±20.44	3	6	9	0	5	4	7	2	7	1	1	3	5	1
BCC (N =59)	67.42±11.18	33	26	58	1	25	34	49	10	35	20	4	25	26	8
SCC (N =29)	56.16±19.23	16	13	29	0	28	13	22	7	14	13	2	12	12	5
MM (N =5)	75.8±6.94	1	4	4	1	4	1	2	3	1	1	3	2	2	1

**Table 2.** Comparison among the distribution of the different combinations of GSTT1 and GSTM1 genotypes in the control population and the skin benign and malignant cases, including basal cell carcinoma (BCC), squamous cell carcinomas (SCC) and malignant melanomas (MM)

Genotype	Population		Benign		BCC		SCC		MM	
	N	(%)	N	%	N	%	N	%	N	%
GSTT1-GSTM1-	15	(12.09)	1	(11.11)	5	(8.47)	2	(6.89)	1	(20.00)
GSTT1-GSTM1+	13	(10.48)	1	(11.11)	5	(8.47)	5	(17.24)	2	(40.00)
GSTT1+GSTM1-	37	(29.83)	3	(33.33)	29	(49.15)	11	(37.93)	0	
GSTT1+GSTM1+	59	(47.58)	4	(44.44)	20	(33.89)	11	(37.93)	2	(40.00)
Total	124		9		59		29		5	

nicity (118 white and 6 non-white versus 100 white and 2 non-white individuals) (F:  $p < 0.0001$ ).

Genotyping of the different types of cancer is presented in Tables 1 and 2. The combined GSTT1+GSTM1- genotype was more frequent among BCC patients (49.1%) than in the control group (29.8%) (F:  $p = 0.04$ ). Hence, this genotype conferred a 2.273 (OR: 95% CI = 1.199-4.308) higher risk for BCC compared to other GSTM1 and GSTT1 combinations of genotypes. GSTP1 did not differ in control and skin benign lesions' patients or non-melanoma cancers. However, 3 out of the 5 MM patients presented a homozygous GSTP1 variant, in contrast to the low prevalence of this variant in the control population (14.5%) (F:  $p = 0.0303$ ). The

presence of a homozygotic variant of GSTP1 gene conferred an 8.8 times higher susceptibility to MM (OR = 8.883; 95% CI = 1.378-56.636).

We were not able to find any significant difference in the rate of any other GST normal or variant alleles in the different types of malignant tumors. There was no association between any other genotypes or between any genotype and the patients' clinical features.

#### DISCUSSION

Cancer of the skin is one of the most powerful examples of how human tumors are a result of the interaction between environmental factors and

personal genetic susceptibility. The most common factor involved in the pathogenesis of non-melanoma skin cancers is the exposure to UVR. However, exposure to large amounts of arsenic, industrial tar, coal, paraffin, certain types of oil, and other chemicals may increase the risk to non-melanoma skin tumors too<sup>1</sup>. One of the mechanisms by which UV light mediates its carcinogenic effect is by stimulating the production of reactive oxygen species, which trigger both DNA damage and abnormal cytoplasmic signal transduction<sup>16</sup>.

Glutathione S-transferases are an important group of antioxidant enzymes that may have evolved to protect cells against reactive oxygen metabolites. The present study demonstrates that the combined GSTT1+GSTM1- genotype predisposes to the development of BCC. Also, the presence of a GSTP1 variant in homozygosis increased the risk for MM, although the small number of cases examined prevents any further conclusion. On the other hand, the present genotyping profile of skin lesions' patients and controls resulted similar to the genetic profile described earlier by our own group and also to other reports on different types of tumors in Brazil<sup>7,8,17-20</sup>.

The precise mechanism of action of GST enzymes is as yet largely unknown but it is accepted that they act via modification of DNA and lipid damage to key tumor suppressor genes or by protection against relevant carcinogens<sup>4,5,16,21</sup>. GSTM1 null genotype has been associated to non-melanoma carcinoma risk, especially in males with multiple BCC and immunosuppressed patients<sup>9,10,12</sup>. In addition, in patients with systemic lupus erithematosus, GSTM1 null was associated with increased production of anti-Ro antibodies, a phenotype associated with marked photosensitivity<sup>22</sup>. Our data suggest a protective effect of the GSTT1 null genotype when combined to GSTM1 null genotype. Other studies have suggested that some detoxifying enzymes may exert a protective effect on some types of tumors, depending on the source of exposure<sup>23</sup>. For instance, *in vitro* studies, mostly conducted on metabolites of butadiene, confirm a protective

action of GSTT1<sup>23</sup>. Indeed, some epoxides are scavenged *in-vitro* systems by GSTT1 and are less dangerous for GSTT1 positive subjects<sup>23</sup>.

There are evidences for a role of GSTP1 in the pathogenesis of skin malignancies. GSTP1 is a major antioxidant in both the epidermis and the dermis, and is overexpressed in a variety of preneoplastic and neoplastic tissues<sup>24</sup>. However, our data do not support an important role of GSTP1 in non-melanoma skin cancer and the small number of MM we studied prevents any conclusion regarding this type of tumor.

We included GSTO2 polymorphism in this study because of GSTO variants lower capacity to biotransform inorganic arsenic<sup>14,15</sup>. Arsenic is a notorious environmental skin carcinogen and contamination of drinking water with inorganic arsenic is a worldwide health problem<sup>24</sup>. A recent expression pattern analysis revealed that GSTO2 was ubiquitously expressed at a low level in all tissues and suggested that it may play an important role in cellular signaling<sup>25</sup>. However, our data do not indicate an important role of GSTO2 in skin cancer carcinogenesis.

It is important to note that the influence of any single genetic polymorphism may have a small contribution on the susceptibility to cutaneous malignancy that is influenced by a multitude of genes that may either protect against or increase the susceptibility to an increasing list of chemical, physical and biological carcinogens. Also, the different GST enzymes have specific endogenous and environmental substrates, a fact that helps explain the difference rate for many cancers described in different populations.

In conclusion, we observed an association between GSTM1 and GSTT1 genotype and the risk for BCC. Although the risk presented by this association had a relatively small OR, it may help to understand the basis of genetic and environmental factors known to predispose to skin cancer, and, therefore, sort out individuals that deserve a special medical attention. Further studies including a larger number of patients are necessary to clarify the role of these genotypes in skin cancer susceptibility and their interaction with genotoxic or cytotoxic agents.

#### REFERENCES

1. ALMAHROOS M, KURBAN AK. Ultraviolet carcinogenesis in nonmelanoma skin cancer. Part I: incidence rates in relation to geographic locations and in migrant populations. *Skinmed* 2004; 3: 29-36.
2. CLAPPER ML. Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep* 2000; 2: 251-6.

3. LICHTENSTEIN P, HOLM NV, VERKASALO PK, ILIADOU A, KAPRIO J, KOSKENVUO M ET AL. Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.
4. VINEIS P. Cancer as an evolutionary process at the cell level: an epidemiological perspective. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1-6.
5. MANNERVIK B. The isozymes of glutathione S-transferase. *Adv Enzymol* 1985; 57: 357-417.
6. KNUDSEN LE, LOFT SH, ALTRUP H. Risk assessment the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutat Res* 2001; 482: 83-8.
7. GRANJA F, MORARI J, MORARI E, CORREA L, ASSUMPCÃO L, WARD L. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. *Cancer Letters* 2004; 209: 129-37.
8. MORARI EC, LEITE JLP, GRANJA F, ASSUMPCÃO LVM, WARD LS. The null genotype of glutathione s-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. *Cancer Epidemiol Bio & Prev* 2002; 11: 1485-8.
9. CARLESS MA, LEA RA, CURRAN JE, APFLEYARD B, GAFFNEY P, GREEN A, GRIFFITHS LR. The GSTM1 null genotype confers an increased risk for solar keratosis development in an Australian Caucasian population. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 1373-8.
10. FRYER AA, RAMSAY HM, LOVATT TJ, JONES PW, HAWLEY CM, NICOL DL ET AL. Polymorphisms in glutathione S-transferases and non-melanoma skin cancer risk in Australian renal transplant recipients. *Carcinogenesis* 2005; 26: 185-91.
11. KANETSKY PA, HOLMES R, WALKER A, NAJARIAN D, SWOYER J, GUERRY D ET AL. Interaction of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 509-13.
12. KERB R, BROCKMOLLER J, SCHLAGENHAUFER R, SPRENGER R, ROOTS I, BRINKMANN U. Influence of GSTT1 and GSTM1 genotypes on sunburn sensitivity. *Am J Pharmacogenomics* 2002; 2: 147-54.
13. LEAR JT, SMITH AG, STRANGE RC, FRYER AA. Detoxifying enzyme genotypes and susceptibility to cutaneous malignancy. *Br J Dermatol* 2000; 142: 8-15.
14. WHITBREAD AK, TETLOW N, EYRE HJ, SUTHERLAND GR, BOARD PG. Characterization of the human omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 131-44.
15. TANAKA-KAGAWA T, JINNO H, HASEGAWA T, MAKINO Y, SEKO Y, HANIOKA N ET AL. Functional characterization of two variant human GSTO1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 301: 516-20.
16. TYRELL RM. UV activation of mammalian stress proteins. *EXS* 1996; 77: 255-71.
17. GATTÁS GJF, KATO M, SOARES-VIEIRA JA, SIRAQUE MS, KOHLER P, GOMES L ET AL. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37: 451-8.
18. GRANJA F, MORARI EC, ASSUMPCÃO LVM, WARD LS. GSTO polymorphism analyses in thyroid nodules suggest that GSTO1 variants do not influence the risk for malignancy. *Eur J Cancer Prev* 2005; 14: 277-80.
19. NASCIMENTO H, COY CS, TEORI MT, BOIN IF, GOES JR, COSTA FF ET AL. Possible influence of glutathione S-transferase GSTT1 null genotype on age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 510-5.
20. ROSSINI A, RAPPOZO DC, AMORIM LM, MACEDO JM, MEDINA R, NETO JF ET AL. Frequencies of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet Mol Res* 2002; 1: 233-40.
21. KETTERER B, TAYLOR J, MEYER D. Some functions of glutathione transferases, in: K. Tew, B. Mannervik, T.J. Mantle, C.B. Pickett and J.D. Hayes, eds. *In Structure and Function of Glutathione Transferases* CRC Press: Boca Raton, FL 1993; 15-27.
22. HEAGERTY A, SMITH A, ENGLISH J, LEAR J, PERKINS W, BOWERS B ET AL. Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas: significant interactions between glutathione S-transferase GSTM1 genotypes, skin type and male gender. *Br J Cancer* 1996; 73: 44-8.
23. OLLIER W, DAVIES E, SNOWDEN N, ALLDERSEA J, FRYER A, JONES P ET AL. Association of homozygosity for glutathione-S-transferase GSTM1 null alleles with the Ro+/La- autoantibody profile in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1763-4.
24. LANDI S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000; 463: 247-83.
25. ROSSMAN TG, UDDIN AN, BURNS FJ. Evidence that arsenite acts as a cocarcinogen in skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198: 394-404.

*Acknowledgments*

We are grateful to Dr. Hamilton Ometto Stolf, dermatologist from UNESP-Botucatu-SP, and Dr Aparecida M. Moraes-UNICAMP-Campinas-SP for kindly providing the samples used in this study.