

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

VÍRUS EPSTEIN-BARR E CARCINOMA MAMÁRIO

Dissertação de Doutoramento em Ciências da Saúde, no ramo de Ciências Biomédicas,
pela Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



Gina Maria Figueiredo Marrão

2008

RESUMO

O Vírus Epstein-Barr (EBV) é um herpesvirus humano ubiqüitário agente da mononucleose infecciosa. É um vírus que tem sido associado ao desenvolvimento de diferentes patologias malignas de natureza epitelial e linfóide, e recentemente associado ao carcinoma da mama, representando um dos tumores mais frequentes nos países ocidentais. Trata-se, além disso de uma doença com alto poder de metastização, com um número significativo de doentes que morre antes dos cinco anos de evolução, após o tratamento primário. É uma doença de evolução pouco previsível, com uma história natural e um prognóstico muito variáveis.

Actualmente 21 estudos (sobre 29 publicados) demonstraram a existência de sequências de EBV a nível dos tumores da mama na mulher. Nenhum destes estudos traz conclusões claras sobre o papel de EBV na patogénese do tumor, principalmente devido à falta de seguimento das doentes ao longo do tempo.

Por conseguinte, realizámos um estudo prospectivo com doentes dos Hospitais da Universidade de Coimbra em estreita relação com o Centro de Histocompatibilidade do Centro e a Universidade Grenoble para tentarmos responder à pergunta do papel do EBV neste tipo de tumores.

Assim, estabelecemos como objectivo principal detectar genoma de EBV quer a nível do tumor quer a nível dos mononucleares do sangue periférico e de associar a esta primeira etapa experimental uma abordagem da resposta imunológica das doentes, essencialmente baseada nas características fenotípicas e funcionais: (i) das células dendríticas e monócitos do sangue periférico, (ii) dos linfócitos T periféricos (incluindo as células dupla positivas $CD4^+/CD8^+$), (iii) e das células NK do sangue periférico. Propusemo-nos comparar o seguimento das doentes em função do seu “estatuto” EBV, mas também os factores clínicos, biológicos e anatomopatológicos utilizados na rotina no Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra: invasão ganglionar, receptores de estrogénio/progesterona, c-erbB-2, histologia tumoral e tamanho do tumor.

Como um todo, os resultados apresentados neste estudo demonstram que: (i) existe uma associação (não significativa) entre a sobrevivência das doentes com cancro da mama e a presença do EBV a nível dos mononucleares do sangue periférico e a nível tumoral; (ii) As células T dupla positivas $CD4^+/CD8^+$ encontram-se aumentadas no sangue periférico das doentes com cancro da mama com melhor sobrevivência global, particularmente as que apresentam um fenótipo de memória efectora, reforçando a ideia de uma potencial actividade antitumoral exercida por estas; (iii) As células T $CD4^+$ e T

CD8⁺ com um fenótipo de memória central encontram-se aumentadas nos vários grupos de doentes estudados, bem como nas doentes EBV positivo ($p < 0,05$) (com diminuição do fenótipo *naïve*) o que traduz assim uma estimulação antigénio específica; (iv) O estudo funcional das células T e NK, mostrou que as doentes, incluindo o grupo de doentes com tumor EBV positivo, que produzem maior quantidade de TNF- α por célula apresentam uma melhor sobrevivência global, o que parece indicar uma melhor actividade funcional destas células, traduzida pela produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo ser um factor de melhor prognóstico; (v) As doentes com uma percentagem mais elevada de células NK CD56⁺/CD57⁻ a expressar granzima B apresentam uma melhor sobrevivência global, uma vez que esta proteína é um dos mecanismos utilizados por esta célula para induzir a apoptose nas células alvo.

Em conclusão, destacamos uma série de novos biomarcadores virais (status do EBV) e imunológicos (características fenotípicas e funcionais) para o acompanhamento das doentes com cancro da mama e por conseguinte susceptíveis de poderem fazer parte dos testes “teragnósticos”.

ABSTRACT

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous human herpesvirus and is the etiologic agent of infectious mononucleosis disease. The EBV is associated with the development of a variety of epithelial and lymphoid malignant pathologies, and recently is closely associated with the breast carcinoma, one of the most frequent tumors in the occidental countries. Moreover, the breast cancer is a disease with a high metastatic propensity and with a significant number of patients dying before the five years of its evolution, after the primary treatment. The development of the disease is not very predictable and its natural history and prognosis are frequently changing.

Currently, 21 studies (out of 29 published) have showed the existence of EBV sequences on woman breast tumors. None of these studies bring new conclusions on the role of EBV in the pathogenesis of the tumor, mainly because of the lack of patient follow-up during a period of time.

Therefore, we made a prospective study in the Hospitals of the University of Coimbra at closely relationship with the Histocompatibility Centre of Coimbra and the University of Grenoble for try to elucidate the role of EBV in this type of tumor.

We establish that the main goal was to detect the EBV both in the tumor and in peripheral blood and if that event is accompanied or is closely correlated with immune response of the patients, mainly based on the immunophenotypic and functional characterization of: (i) the dendritic cells and monocytes, (ii) T lymphocytes subpopulations (including the double positive $CD4^+/CD8^+$ cells), (iii) and NK cells. We also compare the follow-up of the patients according to their EBV “status”, and of the clinical, biological and anatomopathological factors used in a groove based on clinic gynecology: lymph nodes invasion, estrogens/progesterone receptors, c-erbB-2, tumor histology and tumor size.

In general, the results obtained in this study showed that: (i) there is a close correlation between the survival of patients with breast cancer and the presence of the EBV in the peripheral blood and in the tumor; (ii) An increase in the percentage of $CD4^+/CD8^+$ T in the peripheral blood of the patients with breast cancer with a better overall survival, particularly those with a memory effector phenotype, seems to indicate that these cells have a potential antitumoral activity. (iii) The peripheral T $CD4^+$ and T $CD8^+$ cells with a central memory phenotype are increased in all patients groups and in the patients with tumor EBV+ “status” ($p < 0,05$) (with decreasing of the *naïve* phenotype) supporting a role of specific antigen stimulation; (iv) The functional study on T and NK cells showed that the patients, including the group of patients with tumor

EBV⁺ that produce higher amounts of TNF- α , at single cell level, in both cell populations, show a better overall survival, which seems to indicate that a better functional activity of these cells, shows the production of pro-inflammatory cytokines which could be a good prognostic factor; (v) The patients with a increased percentage of NK cells CD56⁺/CD57⁻ expressing granzyme B show a better overall survival, being the protein, one of the mechanisms utilized by these cells to induct an apoptotic death in target cells.

In conclusion, we have developed a series of new virological biomarkers (status EBV) and immunological (at phenotype and functional levels) for the follow-up of the breast cancer patients and include them in “theragnostic” tests.