

## **Protocollo di monitoraggio diagnostico e prognostico del carcinoma a cellule di Merkel (MCC).**

### **Proponenti:**

#### **Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità**

Servizio di Anatomia Patologica

Prof. Renzo Boldorini [renzo.boldorini@med.uniupo.it](mailto:renzo.boldorini@med.uniupo.it) 0321-3733979

#### **Università del Piemonte Orientale**

Laboratorio di Virologia molecolare

Prof.ssa Marisa Gariglio [marisa.gariglio@med.uniupo.it](mailto:marisa.gariglio@med.uniupo.it) 0321-660649/686

### **Obiettivi:**

- Valutare la presenza, carica virale e lo stato di integrazione/mutazione del virus (MCV) nel tumore e sulla cute del paziente (non-lesionale)
- Valutare la risposta anticorpale dell'individuo che ha sviluppato questo tumore e le variazioni nel tempo
- Definire l'assetto genetico del tumore con targeted sequencing o whole exome sequencing (solo se disponibile pezzo fresco congelato)
- Creare una banca dati su base regionale da utilizzare per la messa a punto di nuovi protocolli diagnostici/prognostici

Il carcinoma a cellule di Merkel è un carcinoma cutaneo-neuroendocrino con follow up molto variabile: da aggressivo con prognosi severa ed elevata propensione alla metastatizzazione a media/lunga sopravvivenza senza sviluppo di metastasi. La scarsa conoscenza dei meccanismi di patogenesi e dei fattori prognostici rende difficile un'accurata valutazione prospettica. A livello clinico negli ultimi anni (come riportato nelle recenti linee guida), ha guadagnato progressivamente consenso la tecnica del linfonodo sentinella, contestuale all'asportazione radicale della lesione. Un altro aspetto molto importante che non è ancora stato preso in considerazione in diagnostica è rappresentato dalla valutazione della presenza del Polyomavirus (Merkel Cell Virus, MCV) nel tumore e del suo stato fisico (integrato, deletato, mutato, ecc). MCV appartiene alla famiglia delle Polyomaviridae che comprende virus nudi a DNA doppia elica circolare con genoma di circa 5 kb. Il genoma presenta una organizzazione genica conservata con una regione precoce che codifica per geni funzionali tra cui i geni ad attività oncogena Large T e small T antigen, la regione tardiva che codifica per le proteine capsidi che è una regione intermedia, ipervariabile, di controllo trascrizionale (TCR). Attualmente sono stati identificati 14 polyomavirus umani. I dati a oggi disponibili indicano che questi virus sono ben adattati all'ospite, molto diffusi nella popolazione, mantenuti in basso numero di copie in alcuni distretti preferenziali e difficilmente in grado di dare patologia se non in caso di deficit immunitari. Uno studio condotto dal nostro gruppo su tessuti autoptici da pazienti non selezionati, ha evidenziato la presenza di sequenze genomiche virali di MCV in molti distretti corporei, con alcuni siti preferenziali quali l'apparato respiratorio e urogenitale e gli elementi corpuscolati del sangue. Inoltre, MCV è frequentemente riscontrato sulla cute di soggetti normali in assenza di alcuna manifestazione patologica. Nel 2008, Feng et al. hanno dimostrato la presenza di MCV integrato e mutato nella proteina Large T in tumori a cellule di

Merkel, MCC. Questi dati hanno cambiato radicalmente le conoscenze sulla patogenesi di MCC che è diventata a eziologia virale con meccanismi molto simili a quelli ben noti nell'oncogenesi del carcinoma della cervice uterina da papillomavirus. A differenza di questi però, nel caso di MCC l'associazione con il virus non sembra essere al 100% ma intorno al 50%. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato con analisi genetiche "whole genome sequencing" che i tumori MCV-negativi presentano numerose alterazioni genetiche tipicamente associate all'esposizione UVB (UVB signature) non presente nei tumori MCV-positivi dove quindi l'oncogenesi sarebbe principalmente legata alla persistenza/integrazione del virus. Anche se i dati epidemiologici a disposizione sono attualmente molto scarsi, si comincia a delineare la distinzione nel follow-up tra i due tipi di MCC con una migliore sopravvivenza e ridotto rischio metastasi nel caso dei tumori MCV-positivi. Queste evidenze indicano che è assolutamente necessario migliorare la diagnostica di MCC e l'analisi del follow up al fine di: i) permettere l'avanzamento delle conoscenze virologiche e molecolari sui meccanismi infettivi/carcinogenetici di MCV; e ii) mettere a punto nuove linee guida per la diagnosi e il trattamento del paziente con MCV che siano basate su dati statisticamente significativi.

Sulla base di questa premessa, la proposta del nostro gruppo di lavoro è di creare una rete oncologica di sorveglianza, diagnosi e terapia di MCC che permetta di: i) concentrare tutti i campioni biologici (post-diagnosi, che verrebbe comunque effettuata presso le anatomie patologiche della Regione), di pazienti MCC presso i proponenti (Boldorini e Gariglio, AOU-Novara); ii) raccogliere tutte le informazioni cliniche dei pazienti alla prima diagnosi e in follow up in data base; iii) eseguire diagnosi virologica e genetica su tutti i campioni. E' importante sottolineare che per la diagnostica molecolare il campionamento migliore è rappresentato dal tessuto tumorale fresco (non fissato e paraffinato ma semplicemente congelato a -80°C) e quindi sarebbe opportuno mettere in atto tutti gli sforzi possibili per ottenere questo tipo di campione. Considerando che molto spesso la diagnosi di MCC viene confermata ex post potrebbe essere difficile conservare parte del tumore a fresco come congelato. In caso di secondo intervento per recidiva o allargamento resezione chirurgica il pezzo fresco potrà essere recuperato. Compatibilmente con i fondi disponibili, il DNA di questi tumori verrà analizzato anche in whole genome sequencing. Questa indagine permetterà di definire il/i punto/i di integrazione del virus nel genoma cellulare e la molecular signature del tumore. Il genoma di MCV verrà comunque amplificato in PCR e sequenziato anche sui campioni paraffinati al fine di identificare mutazioni o delezioni nel genoma virale, a confronto con il virus identificato sulla cute non lesionale. La realizzazione di questa rete MCC e la raccolta prospettica in follow up di campioni biologici supportati da data base dettagliato costituisce un progetto molto ambizioso per la Regione Piemonte che potrà essere sicuramente sfruttato anche per altre indagini future non specificatamente presenti in questo progetto anche in funzione delle nuove conoscenze provenienti dalla ricerca di base.

## **Bibliografia**

[Merkel cell polyomavirus: a newly discovered human virus with oncogenic potential.](#)

Spurgeon ME, Lambert PF. Virology. 2013 Jan 5;435(1):118-30.

[Merkel cell polyomavirus, a highly prevalent virus with tumorigenic potential.](#)

Grundhoff A, Fischer N. Curr Opin Virol. 2015 Oct;14:129-37

[Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer.](#) Chang Y, Moore PS. Annu Rev Pathol. 2012;7:123-44.

[A cornucopia of human polyomaviruses.](#) DeCaprio JA, Garcea RL. Nat Rev Microbiol. 2013 Apr;11(4):264-76.

[Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma.](#)

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS., Science. 2008 Feb 22;319(5866):1096-100

[Next generation sequencing of Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma reveals ultraviolet-signature mutations and recurrent TP53 and RB1 inactivation.](#)

Harms PW, Collie AM, Hovelson DH, Cani AK, Verhaegen ME, Patel RM, Fullen DR, Omata K, Dlugosz AA, Tomlins SA, Billings SD. Mod Pathol. 2016 Mar;29(3):240-8

[UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCV-Negative Merkel Cell Carcinomas.](#)

Wong SQ, Waldeck K, Vergara IA, Schröder J, Madore J, Wilmott JS, Colebatch AJ, De Paoli-Iseppi R, Li J, Lupat R, Semple T, Arnau GM, Fellowes A, Leonard JH, Hraby G, Mann GJ, Thompson JF, Cullinane C, Johnston M, Shackleton M, Sandhu S, Bowtell DD, Johnstone RW, Fox SB, McArthur GA, Papenfuss AT, Scolyer RA, Gill AJ, Hicks RJ, Tothill RW. Cancer Res. 2015 Dec 15;75(24):5228-34

[Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma is infrequently associated with the Merkel cell polyomavirus.](#) Miner AG, Patel RM, Wilson DA, Procop GW, Minca EC, Fullen DR, Harms PW, Billings SD. Mod Pathol. 2015 Apr;28(4):498-504.

[Large T and small T antigens of Merkel cell polyomavirus.](#) Wendzicki JA, Moore PS, Chang Y. Curr Opin Virol. 2015 Apr;11:38-43

[Merkel cell polyomavirus and p63 status in Merkel cell carcinoma by immunohistochemistry: Merkel cell polyomavirus positivity is inversely correlated with sun damage, but neither is correlated with outcome.](#)

Dabner M, McClure RJ, Harvey NT, Budgeon CA, Beer TW, Amanuel B, Wood BA. Pathology. 2014 Apr;46(3):205-10

[Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma.](#)

Samimi M, Molet L, Fleury M, Laude H, Carlotti A, Gardair C, Baudin M, Gouguet L, Maubec E, Avenel-Audran M, Esteve E, Wierzbicka-Hainaut E, Beneton N, Aubin F, Rozenberg F, Dupin N, Avril MF, Lorette G, Guyetant S, Coursaget P, Touzé A. Br J Dermatol. 2016 Apr;174(4):813-22.

[C-terminal deletions of Merkel cell polyomavirus large T-antigen, a highly specific surrogate marker for virally induced malignancy.](#)

Schmitt M, Wieland U, Kreuter A, Pawlita M. Int J Cancer. 2012 Dec 15;131(12):2863-8.