

JOSÉ CARLOS MANN PRADO

Detecção e caracterização molecular de Poliomavírus de células de Merkel em carcinomas de células de Merkel

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2019

JOSÉ CARLOS MANN PRADO

Detecção e caracterização molecular de Poliomavírus de células de Merkel em carcinomas de células de Merkel

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Enrique Mario Pierulivo

Versão corrigida

São Paulo

2019

Mann Prado, José Carlos

Detecção e caracterização molecular de Poliomavírus de células de Merkel em carcinomas de células de Merkel / José Carlos Mann Prado; orientador Enrique Mario Pierulivo. -- São Paulo, 2019.
120 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. vírus da DNA. 2. câncer de pele. 3. sequenciamento genético. 4. prevalência viral . I. Pierulivo, Enrique Mario, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): José Carlos Mann Prado

Titulo da Tese: Detecção e caracterização molecular do Poliomavírus de células de Merkel em carcinomas de células de Merkel

Orientador: Enrique Mario Boccardo Pierulivo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 26 de junho de 2014.

PARECER 1185/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Detecção e caracterização molecular de poliomavírus de células de merkel*" do Pesquisador ENRIQUE MARIO BOCCARDO PIERULIVO e aluno JOSÉ CARLOS MANN PRADO

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: icb.usp.br.

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.06.2015**.

Atenciosamente,

Prof.ª Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

**DEDICO ESSE TRABALHO A MINHAS FILHAS
AMO VOCÊS IMENSAMENTE**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais pelo ensinamento de como viver de uma forma coerente. Um beijo mãe, saudades do pai.

Agradeço imensamente a chance que me foi dada pelo Prof. Enrique. Desde o princípio um projeto maravilhoso e com contribuições muito produtivas. Mas o que mais atrai na convivência com o Prof. Enrique, é sua simplicidade. Simplicidade com que lida com os problemas do cotidiano do laboratório e também quando lida com o saber, o ensinar. O conhecimento está muito fundamentado e, para o Enrique, o conhecimento é algo que traz em sua bagagem com a mesma paixão, a mesma leveza que compartilha com o futebol. Esse conhecimento faz com que ele veja as questões de conhecimento de uma forma simples. Apesar do grande esforço, foi maravilhoso, obrigado amigo.

Agradeço a Diretoria da área Bioindustrial do Instituto Butantan, pela colaboração e incentivo nesta etapa, na pessoa da Dra. Elisabeth Cristina Tenório.

Agradeço a Dra. Luisa Lina Villa, pela amizade, liberdade que permitiu que participasse de seu grupo e também por usar seu laboratório. Um grande abraço.

Agradeço muito a participação no projeto da Dra. Lara Termini. Sua conduta rígida e postura metodológica permitiram que os resultados fossem os melhores. Obrigado.

Agradeço ao Serviço de Patologia do Departamento de Anatomia Patológica, do AC Camargo Center, na pessoa do Dr. Clóvis Pinto.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Oncovirologia, Bruna, Andressa, Filipe, Lucas, Vanesca e Suellen. Salve a Telma!!! Obrigadíssimo Telma. Um Abraço.

Agradeço ao pessoal do Departamento de Microbiologia pelo convívio e ajuda, sempre muito amigável e cativante.

Agradeço ao pessoal do CMN, Raquel, Ricardo, Mirian, Rafaela e Gabriela. No cansaço um papo de corredor é o que temos para alegrar a rotina, obrigado.

Agradeço ao pessoal do ICESP, Dra. Laura, Joazinho, Neide e os novos que não param de chegar. Obrigado pela ajuda. Poder contar e um suporte maravilhoso, obrigado.

Agradeço aos funcionários do ICB pela amizade, obrigado.

Agradeço aos pacientes pela oportunidade de acesso as amostras, muito obrigado.

Agradeço as agências de financiamento pelo apoio ao projeto INCT-HPV (FAPESP 2008/57889-1; CNPq 573799/2008-3)

RESUMO

Mann Prado, J.C.. Detecção e caracterização molecular de Poliomavírus de células de Merkel em carcinomas de células de Merkel. Tese de doutorado no Programa de Pós graduação da Microbiologia - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019

O carcinoma de células de Merkel (CCM) é uma neoplasia rara, muito agressiva que afeta principalmente indivíduos maiores de 50 anos e com o sistema imunológico comprometido. A associação do Poliomavírus humanos 5 (MCPyV) ao CCM foi estabelecida e é aceita até o momento como a única associação positiva entre um Poliomavírus e uma neoplasia em humanos. No entanto, dados como prevalência viral e presença de possíveis variantes moleculares específicas de uma determinada região geográfica não têm sido analisados em amostras do Brasil. No presente estudo, analisamos 84 amostras de 57 pacientes diagnosticados com CCM obtidas do AC Camargo Cancer Center, visando determinar: i) a prevalência de MCPyV; ii) as características filogenéticas das sequências virais identificadas por sequenciamento; iii) a prevalência de co-infecção com HPV e iv) avaliar o padrão de expressão de proteínas relacionadas a perda de polaridade celular. Através dessa análise determinamos que a prevalência viral nas amostras estudadas é de 94,8%. Na caracterização das sequências geradas, analisamos os fragmentos virais LT3 e VP1 e identificamos quatro variantes moleculares correspondentes a três variantes e a sequência protótipo em cada um destes. As variantes identificadas foram comparadas às descritas em banco de dados e suas sequências foram utilizadas para construir árvores filogenéticas. Dessa maneira, verificamos uma distribuição ampla e aleatória das variantes identificados nos ramos destas árvores. Finalmente, analisamos o padrão de expressão de proteínas relacionadas ao evento de perda de polaridade. De maneira geral, não observamos diferenças significativas entre os padrões de marcação para as proteínas analisadas individualmente entre amostras positivas em negativas para o vírus.

Palavra chaves: Vírus de DNA. Câncer de pele. sequenciamento

ABSTRACT

Mann Prado, J.C.. Detection and molecular characterization of Merkel cell Polyomavirus in Merkel cell carcinoma carcinomas de células de Merkel. [thesis (Ph.D thesis in Microbiology)] - São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare, very aggressive neoplasm that mainly affects individuals older than 50 years and with compromised immune systems.

The association of human Polyomavirus 5 (MCPyV) with CCM has been established and is accepted to date as the only positive association between a Polyomavirus and a neoplasm in humans. However, data such as viral prevalence and the presence of possible molecular variants specific to a given geographical region have not been analyzed in samples from Brazil. In the present study, we analyzed 84 samples from 57 patients diagnosed with CCM obtained from the AC Camargo Cancer Center, in order to determine: i) the prevalence of MCPyV; ii) the phylogenetic characteristics of the viral sequences identified by sequencing; iii) the prevalence of HPV co-infection and iv) to evaluate the expression pattern of proteins related to loss of cellular polarity. Through this analysis we determined that the viral prevalence in the samples studied was 94.8%. In the characterization of the generated sequences, we analyzed the viral fragments LT3 and VP1 and identified four molecular variants corresponding to three variants and the prototype sequence in each of these. The identified variants were compared to those described in the database and their sequences were used to construct phylogenetic trees. In this way, we verified a wide and random distribution of the variants identified in the branches of these trees. Finally, we analyzed the expression pattern of proteins related to the loss of polarity event. In general, we did not observe significant differences between the marking patterns for the proteins analyzed individually between positive samples in negative for the virus

Keywords: DNA vírus. Skin Cancer. Sequencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Carcinoma de células de Merkel.....	30
Figura 2: Linha do tempo e isolamento dos HPyV.....	34
Figura 3: Genoma do MCPyV.....	38
Figura 4: Região precoce e mRNA.....	39
Figura 5: Pele em esquema e corte.....	42
Figura 6: Genoma do HPV.....	46
Figura 7: Epitélio estratificado e ciclo viral.....	47
Figura 8: Esquema representativo	56
Figura 9: Árvore filogenética das variantes LT3.....	69
Figura 10: Árvore filogenética das variantes VP1	70
Figura 11: Árvore filogenética das variantes concatenadas.....	72
Figura 12: Exemplos de IHQ.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de HPyV.....	33
Tabela 2: Caractrística da casuística.....	52
Tabela 3: Amostras incluídas no estudo.....	53
Tabela 4: Descrição dos tumores primários quanto a localização.....	53
Tabela 5: Entidades histológicas.....	54
Tabela 6: Lista de iniciadores.....	55
Tabela 7: Descrição das condições de Imuno-histoquímica	60
Tabela 8: Condições para uso na PCR do MCPyV	63
Tabela 9: Iniciadores.....	64
Tabela 10: Amostra negativas para MCPyV.....	65
Tabela 11: Variantes de MCPyV em LT3.....	66
Tabela 12: Variantes de MCPyV em VP1.....	67
Tabela 13: Sequencias concatenadas.....	71
Tabela 14: Positividade para HPV nas amostras.....	74
Tabela 15: Positividade por marcadores por tecido.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1. Carcinoma de células de Merkel.....	29
1.2. A Pele e microbiota associada.....	31
1.3. Os Poliomavírus.....	32
1.3.1. Poliomavírus em humanos.....	33
1.3.2. Biologia dos poliomavírus.....	35
1.4. Poliomavírus de células de Merkel	37
1.4.1. Biologia do MCPyV	37
1.4.2. Epidemiologia do MCPyV	41
1.5. A células de Merkel.....	41
1.6. Segunda neoplasia em pacientes com CCM	44
1.7. Os papilomavírus humanos.....	44
1.7.1. Epidemiologia do HPV.....	48
1.8. Polaridade celular	49
2 OBJETIVO	51
2.1. Objetivos específicos.....	51
3 MATERIAL E MÉTODOS	52
3.1. Característica das amostras em estudo.....	52
3.2. Extração de DNA a partir de amostras parafinadas.....	54
3.3. Detecção de MCPyV por PCR.....	55
3.4. Detecção de HPV por PCR.....	57
3.5. Coloração de gel da acrilamida.....	57
3.6. Sequenciamento pelo método de Sanger.....	57
3.7. Análise filogenética das amostras.....	58
3.8. Tipagem de Alfa e Betapapilomavírus.	58
3.9. Detecção e tipagem de HPV pela técnica “INNO-LIPA”.	59
3.10. Reação de imuno-histoquímica.....	59
3.11. Clonagem dos produtos de PCR.....	60
3.12. Obtenção de bactérias competentes.....	61
3.13. Transformação de bactérias competentes.....	61
3.14. Isolamento de plasmídeos	62
4 RESULTADOS	63

4.1. Padronização do protocolo de detecção	63
4.2. Padronização das reações de PCR.....	64
4.3. Determinação da prevalência de MCPyV.....	65
4.4. Caracterização molecular dos fragmentos LT3.....	66
4.5. Caracterização molecular dos fragmentos VP1.....	67
4.6. Análise filogenética das variantes MCPyV.....	68
4.6.1. Análise filogenética dos fragmentos LT3.	69
4.6.2. Análise filogenética dos fragmentos VP1.....	70
4.6.3. Análise filogenética dos fragmentos LT3 e VP1.	71
4.7. Detecção de HPV.....	72
4.8. Reação de imuno-histoquímica.....	74
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÕES	84
APÊNDICES	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Carcinoma de células de Merkel

O carcinoma de células de Merkel (CCM) foi descrito em 1972 por Toker como sendo um carcinoma trabecular de pele (1). O CCM é uma neoplasia rara e muito agressiva, também chamada de carcinoma neuroendócrino primário de pele (2). Dados dos Países Baixos mostram uma incidência de 0,35/100.000 habitantes por ano (3) enquanto nos EUA é de 0,24 – 1,79/100.000 habitantes por ano (2,4). Já na Austrália, em Queensland, onde a maioria dos habitantes é caucasiana, a incidência aumenta drasticamente para 1,6/100.000 habitantes por ano (2,5). Os dados obtidos a partir de diversos estudos indicam que homens são mais acometidos que mulheres (61% contra 39%) (5,6) com maior prevalência em indivíduos brancos e maiores de 65 anos (4). O CCM ocorre como uma lesão nodular; de coloração vermelho-azulada; mais comumente encontrada sobre tecidos moles; tendo algumas vezes a ocorrência concomitante de telangiectasia; situado na maioria das vezes em regiões expostas à radiação solar intensa e apresentando crescimento rápido. O acrônimo AEIOU, A – *Asymptomatic* (assintomático); E – *Expanding rapidly* (crescimento rápido, ≤ 3 meses); *Immunosuppression* (imunocomprometidos); O – *Older than age 50* (maiores de 50 anos); U – *UV exposed site* (regiões expostas à UV) descreve as características principais desta neoplasia (7). Apesar de sua associação positiva com imunossupressão, somente 10 % dos casos são relacionados a esta condição (2). A grande maioria dos tumores ocorre em regiões expostas diretamente à radiação solar, conforme descrito a seguir. Sua ocorrência, por sítio anatômico, varia de 41% a 50% em cabeça e pescoço, 32% a 38% em extremidades e de 12% a 14% no tronco (8). No entanto, outras regiões menos expostas à radiação solar, incluindo a genitália e mucosas, podem ser acometidas (7). Dados de uma população estadunidense, analisada retrospectivamente, mostrou que casos de CCM em negros tendem a ocorrer com maior frequência em sítios localizados nas extremidades dos membros inferiores (9). O diagnóstico definitivo desta neoplasia é dado por meio da análise histopatológica de biópsias. A taxa de sobrevida livre de doença depende da presença de metástases e sua localização em relação ao tumor primário no momento de diagnóstico. Assim, as estimativas de sobrevida livre de doença nos casos de doença localizada, doença com metástase local e casos com metástase a distância é de 51, 35 e 14 %, respectivamente (2). Em tumores primários localizados, o Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer – AJCC (do inglês, *American Joint Committee on Cancer*) utiliza a

análise de tamanho do tumor e a presença de invasão do tecido da derme como parâmetros para classificá-los. Deste modo, tumores com tamanho menor ou igual a dois centímetros (cm), tumores com tamanho maior que 2 cm mas menores que 5 cm e finalmente tumores maiores que 5 cm, são denominados T1, T2 e T3, respectivamente. Já tumores com envolvimento de tecido da derme são classificados como T4 (2). Como em outros tumores neuroendócrinos, é observada: i) a presença de células pequenas e ovoides com núcleos hipercromáticos; ii) numerosas células em mitose e/ou apoptose e iii) arquitetura citológica trabecular, nodular ou de padrão difuso (10). Análises realizadas por imuno-histoquímica utilizando marcadores neuroendócrinos (neurofilamentos) e epiteliais (citoqueratina 20) são utilizadas para definir o diagnóstico (11). A figura 1 mostrar o aspecto clínico de alguns casos de CCM no momento do diagnóstico.

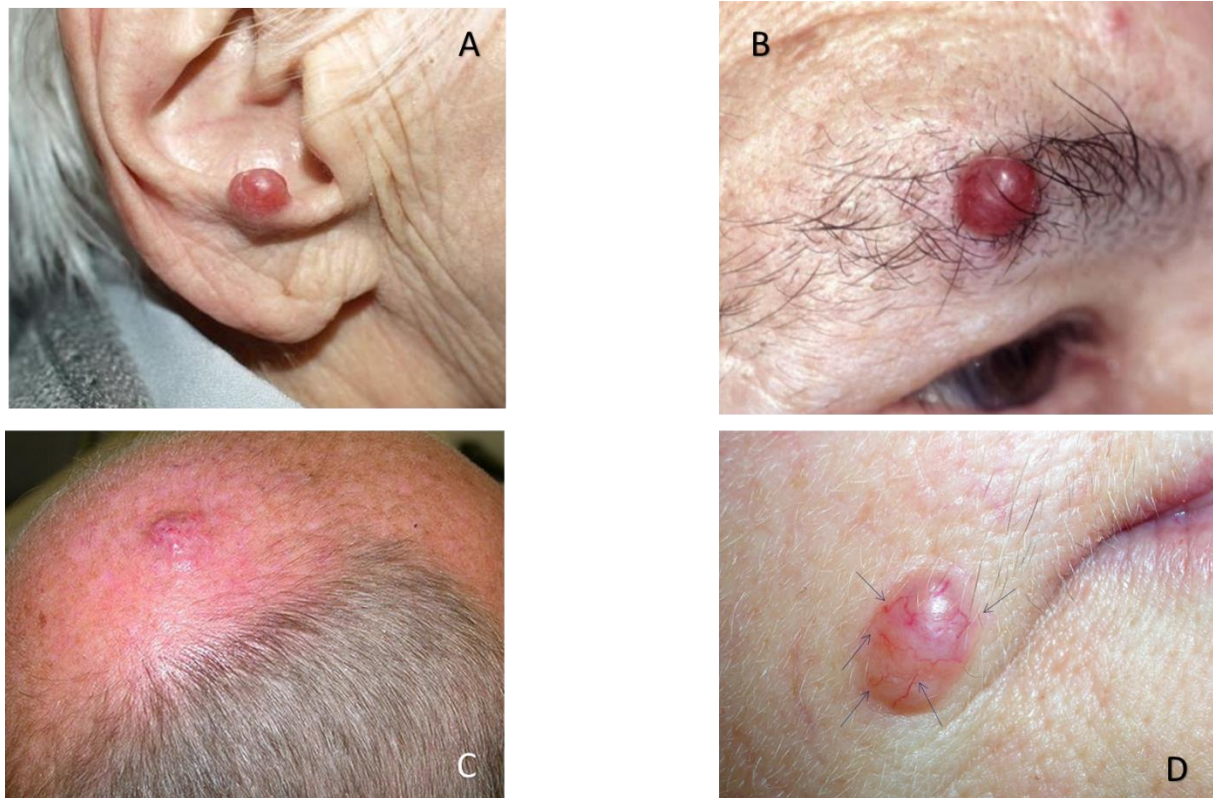


Figura 1: Carcinoma de células de Merkel. Aspecto clínico de carcinomas de células de Merkel. Nesta figura são apresentados alguns exemplos de CCM localizados na região da cabeça, mais especificamente na orelha (A), na sobrancelha (B), no couro cabeludo (C) e no rosto (D). São observados alguns dos aspectos característicos que podem estar presentes em CCM, como telangiectasia, indicado pelas setas em D, tamanhos menores que 2 cm, em (A), área de ocorrência e sua exposição à irradiação UV. A-C <https://skincheck.com.au/skinclinic/merkel-cell-carcinoma/>; D www.accessmedicine.com.

1.2. A pele e a microbiota associada.

A pele é um órgão que apresenta funções fisiológicas cruciais nos organismos e também é a primeira barreira ao meio externo. Sua estrutura em multicamada apresenta um programa de diferenciação celular que culmina quando ocorre o desprendimento junto com a camada cornificada. Esse órgão apresenta uma microbiota específica. Neste contexto as relações interespecies estabelecidas com esses microrganismos podem ser diversas (12). Na pele são encontradas bactérias, fungos, protozoários e também vírus (12,13,14). No caso das bactérias, patogênicas ou não, foi verificado que a sua presença pode ocorrer em situações onde uma relação de simbiose, ou comensalismo, é definida (12). No caso de infecções por fungos na pele humana, sabe-se que são comumente encontradas em países como o Brasil e são restritas à camada córnea do epitélio (15). Além disso, vírus de diferentes famílias podem contribuir para essa microbiota. Analisando pele de aspecto normal, através de sequenciamento de nucleotídeos em larga escala, foi observado que 37% das sequências obtidas eram provenientes das famílias *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae* e *Circoviridae* (16). No início da década de 70 surgiram os primeiros achados relacionando papilomavírus humanos (HPV) em indivíduos acometidos com Epidermodisplasia Verruciforme (17). Posteriormente foi determinado que a presença de alguns tipos de HPV apresentava uma associação positiva com o câncer de pele nesses indivíduos (18). No caso dos poliomavírus a determinação de sua prevalência na pele humana dependeu do desenvolvimento tecnológico para a detecção de indicadores da presença viral. Assim, em 2008 foi realizada a primeira descrição de um isolado de poliomavírus em amostra proveniente de pele humana com lesão (19). Hoje sabemos que em pele humana são encontrados alguns tipos de poliomavírus humanos (MCPyV, 6 e 7) e vários tipos de HPV, (HPV5, 9, 75 e outros), particularmente do gênero Betapapilomavírus e Gamapapilomavírus (16,20). Recentemente a associação entre outros Betapapilomavírus e o desenvolvimento tumoral foi determinada em modelo murino (21).

1.3. Os Poliomavírus.

A nomenclatura adotada para classificação dos poliomavírus também acompanhou as mudanças advindas dos avanços tecnológicos usados nestas caracterizações. Assim, até o final do século passado os poliomavírus eram classificados junto com os papilomavírus, na família *Papovaviridae*.

Posteriormente, em 1999, a família *Papovaviridae* foi separada em duas famílias distintas, *Polyomaviridae* e *Papillomaviridae* (22). Em 2010 os diferentes poliomavírus foram subclassificados em função dos organismos infectados. O gênero *Polyomavirus*, que antes era o único dentro da família *Polyomaviridae*, foi dividido criando os gêneros *Orthopolyomavirus* e *Wukipolyomavirus* para conter os vírus encontrados em mamíferos e *Avipolyomavirus* para aqueles identificados em aves (23).

Atualmente, segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), a família *Polyomaviridae* divide-se em cinco gêneros: *Alphapolyomavirus*, com total de 37 espécies de animais e de humanos, incluindo os poliomavírus humanos 5, 8, 9, 12 e 13; *Betapolyomavirus*, com 29 espécies de animais e de humanos, representados pelos poliomavírus humanos 1 a 4; *Deltapolyomavirus* com apenas representantes de poliomavírus humanos, 6, 7, 10 e 11; *Gammapolyomavirus* com apenas sete espécies de animais, onde encontram-se os poliomavírus de aves e outro gênero ainda *não classificado* com três espécies de animais (7,24).

Segundo Calvignac (2016), para que um isolado seja definido como uma nova espécie os seguintes critérios devem ser respeitados: i) disponibilização da sequência completa do genoma do isolado em banco de dados públicos e com publicação definindo essa disponibilização; ii) o genoma deve apresentar estrutura semelhante à estrutura genômica característica dos membros do grupo, isto é, molécula de DNA circular de dupla fita com três regiões, uma controladora e duas com diferença temporal de expressão (precoce e tardia), transcritas no sentido oposto tomando como referência a origem de replicação; iii) hospedeiro identificado; e iv) a sequência do gene que codifica o antígeno T deve apresentar identidade inferior a 85% com a sequência do antígeno T de todos os poliomavírus conhecidos (24).

1.3.1. Poliomavírus em humanos.

A identificação dos diversos poliomavírus que infectam humanos ocorreu em momentos tecnológicos distintos que permitiram uma crescente sensibilidade de detecção. Conforme descrito na tabela 01, é mostrado o momento do isolamento do HPyV, material de origem da amostra e a técnica usada para tanto.

Tabela 1: Lista dos HPyV. São identificados a nomenclatura existente incluindo a nomenclatura adotada pelo ICTV, seu material de origem e a metodologia usada para seu isolamento.

ISOLADO*	HPyV [@]	ORIGEM DA AMOSTRA	METODOLOGIA
BKPyV	HPyV1	Células de epitélio uretral; paciente insuficiência renal	subcultura e M.E.
JCPyV	HPyV2	Macerado de cérebro; paciente encefalopatia	subcultura e M.E.
KIPyV	HPyV3	Lavado de nasofaringe; indivíduo assintomático	clonagem e sequenciamento
WUPyV	HPyV4	Lavado de nasofaringe; paciente com pneumonia	<i>shotgun</i>
MCPyV	HPyV5	Carcinoma de células de Merkel	subtração digital de transcritos
HPyV6	HPyV6	Pele; indivíduo assintomático	RCA
HPyV7	HPyV7	Pele; indivíduo assintomático	PCR
TSPyV	HPyV8	Paciente Tricodisplasia Espinulosa.	RCA
HPyV9	HPyV9	Soro; paciente transplantado	PCR
MWPyV	HPyV10	Fezes indivíduo assintomático	RCA
STLPyV	HPyV11	Fezes indivíduo assintomático	pirosequenciamento
HPyV12	HPyV12	Fezes; paciente transplantado	PCR
NJPyV	HPyV13	Biópsia; paciente transplantado	RT-PCR
LIPyV	HPyV14	Pele; indivíduo assintomático	RCA

[@] nomenclatura ICTV; *nome dado ao isolado: BKPyV, sem dados quanto a BK, *polyomavirus*; JCPyV, John Cunningham, *polyomavirus*, KIPyV, *Karolinska Institute, polyomavirus*; WIPyV, *Washington University, polyomavirus*, MCPyV, *Merkel Cell Carcinoma, polyomavirus*, HPyV6, 7, 9, 12, numeração aplicada aos isolados na sequência de isolamento; TSPyV, *tricodisplasia espinulosa, polyomavirus*; MWPyV, *Malawi, polyomavirus*; STLPyV, *Sant Louis, polyomavirus*; NJPyV, *New Jersey, polyomavirus* e LIPyV, *Lyon Iarc, polyomavirus*. **M.E.:** microscopia eletrônica; **RCA:** amplificação por círculo rolante, do inglês *Rolling Circle Amplification*

Assim, em 1971 (25,26) foram descritos os primeiros isolados, JCV e BKV, e permaneceram por muito tempo como os únicos do grupo detectados em humanos. Através das inovações tecnológicas os demais HPyV foram isolados e finalmente com a implementação do sequenciamento de nova geração, outros tipos foram descritos, totalizando quatorze isolados. Os diferentes tipos de HPyV descritos até o momento, o ano de sua descrição, sua referência original assim como o material de origem estão descritos na Figura 2.

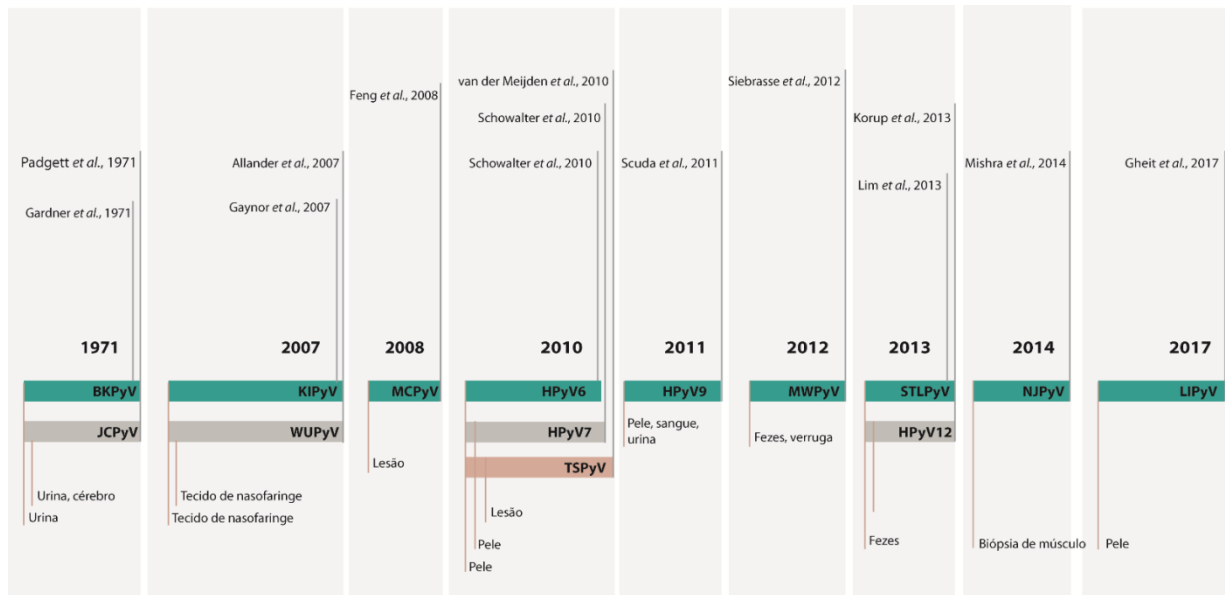


Figura 2. Linha de tempo e descrição dos isolados de origem dos HPyV. Nesta imagem temos uma linha do tempo mostrando a descrição dos diferentes poliomavírus humanos. São apresentados os dados cronológicos referentes à identificação dos diferentes HPyV juntos às referências originais e o material utilizado. Reproduzido de (27).

Alguns poliomavírus detectados em seres humanos são associados a doenças graves em indivíduos imunocomprometidos. Dentre eles podemos citar o JCPyV, cuja sigla remete ao nome do paciente de origem do isolado em inglês, “John Cunningham Polyomavirus”, BKPyV, sigla sem referência conhecida, o MCPyV sigla que descreve a célula de origem do tumor, também em língua inglesa, “Merkel Cell Polyomavirus” o TSPyV sigla que descreve a doença em que esse vírus foi isolado, também em língua inglesa, “Trichodyspasia Spinulosa Polyomavirus”.

Estes poliomavírus humanos são ubíquos e de alta prevalência na população normal. Em humanos saudáveis a infecção pelos poliomavírus além de assintomática, é confirmada logo na primeira infância. Isso se reflete na prevalência extremamente alta (>80 %), determinada por medida sorológica, na fase adulta (28,29). Em indivíduos imunocomprometidos, alguns tipos virais estão relacionados com o surgimento de diferentes doenças. Por exemplo, a infecção por BKPyV está associada a nefropatias e cistite hemorrágica e a infecção por JCPyV está associada à leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML - *Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*). Além disso, em pele temos a infecção por poliomavírus de células de Merkel (MCPyV) e sua associação ao desenvolvimento de CCM e por TSPyV que está associado a doença hiperproliferativa benigna tricodisplasia spinulosa (TS). No caso do MCPyV, este vírus é classificado como provável carcinógeno em humanos, ou carcinógeno tipo 2A, pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (30).

1.3.2. Biologia dos poliomavírus.

O genoma dos poliomavírus é formado por uma molécula de circular DNA de dupla fita, com aproximadamente 5.000 pares de bases (pb) e divide-se em três regiões: a região controladora, a região que codifica proteínas precoces e a região que codifica proteínas tardias. A região controladora apresenta apenas função regulatória do ciclo natural e nenhum produto é expresso a partir desta. Para exercer sua função regulatória esta região do genoma viral contém a origem de replicação e os promotores que regulam a transcrição dos genes precoces e tardios. Ambas as fitas do genoma dos poliomavírus são codificantes e a região precoce é expressa por uma das fitas logo após a infecção enquanto a região tardia é expressa após a replicação do genoma viral, pela fita oposta. Os genes da região precoce codificam as proteínas envolvidas na regulação da transcrição e replicação virais. Essas proteínas são chamadas de antígenos T, e suas isoformas recebem denominações distintas para os diferentes tipos de poliomavírus. Cabe ao antígeno T atuar tanto na replicação viral quanto na transcrição (31). Essas proteínas receberam a denominação “T” por serem reconhecidas por anticorpos de roedores portadores de tumores (32). A atividade transformante dos membros deste grupo é exemplificada pelo potencial transformante, *in vitro*, do Vírus de Símio 40 (SV40) (33)

O antígeno T maior é constituído de aproximadamente 700 aminoácidos, na forma de uma fosfoproteína de localização nuclear, mas que pode sofrer alternância da sua localização, dependendo de seu nível de fosforilação (34,35). O antígeno T e suas isoformas são proteínas multifuncionais que, além de regular o ciclo viral interagem com diversas proteínas celulares. Entre essas interações podemos destacar pRb, p53 o que resulta na indução da célula hospedeira a entrar no ciclo celular possibilitando a replicação do genoma viral através do uso da maquinaria de replicação celular (36,37).

Na região tardia do genoma encontram-se os genes que codificam as proteínas estruturais formadoras do capsídeo viral, tais como VP1 e VP2. Em alguns tipos de poliomavírus podem ser encontradas outras proteínas estruturais como VP3 e VP4. Diferentes sistemas de expressão heterólogos foram utilizados para obtenção da proteína VP1 isolada e nestes a proteína isolada demonstrou ser capaz de montar uma estrutura semelhante ao capsídeo - VLP (*virus like particle*) (28,38,39,41). As proteínas estruturais tardias são proteínas nucleares, fato relativo ao sítio de montagem da partícula durante o ciclo natural do vírus. VP1 é a proteína majoritária para formação dos pentâmeros. A porção carboxi terminal da proteína VP1 se estende além da estrutura pentamérica ligando-se ao próximo pentâmero. Os capsômeros têm sua estrutura estabilizada pela presença de cálcio e pontes dissulfeto. Alguns tipos como o JCPyV, o BKPyV e também o SV40

apresentam na região tardia um gene que codifica uma proteína com função regulatória. Essa proteína, chamada agnoproteína, apresenta localização citoplasmática (42).

Acredita-se que, a interrupção do ciclo natural do vírus é fundamental no processo de transformação celular e tumorigênese associados à infecção por poliomavírus (Ver abaixo).

A presença do antígeno T é uma característica universal dos poliomavírus. Na região N-terminal existe um domínio DnaJ que contribui tanto para a replicação viral quanto para a ligação ao fator celular HSc70, uma chaperona. Existe também o motivo LXCXE, o qual se liga à proteína supressora de tumor associada ao retinoblastoma (pRB), e também a outras proteínas relacionadas ao RB, como p107 (RLB1) e p130 (RBL2). DnaJ e LXCXE em conjunto causam a perturbação do complexo pRB/E2F, o que resulta na progressão do ciclo celular (31). Na região C terminal do antígeno T do MCPyV existe uma região de homologia com o SV40, a qual contém um resíduo de treonina que, quando fosforilada, compete com a ciclina E1 e MYC na ligação ao FBXW7. A proteína FBXW7 faz parte do complexo ubiquitina ligase formado pelas proteínas Skp1/culina /F-box (SCF), sendo ela o componente F-box. Esta competição previne a degradação da ciclina E1 e MYC, favorecendo o crescimento e a proliferação celulares (43). Possui ainda os seguintes domínios: o domínio de ligação à origem (OBD) que se liga à origem de replicação; o domínio NLS, que é necessário para a localização nuclear da proteína; o domínio Helicase (contendo os domínios Zn e os de ligação a nucleotídeos) e, finalmente, o domínio de ligação a p53 (44). Estudos anteriores demonstraram o a co-localização de p53 e do antígeno T de BKPyV em culturas de neuroblastomas (45) e próstata (46). Acredita-se que esse efeito causaria o bloqueio da expressão de genes dependentes de p53 em resposta a sinais de danos ao DNA (44).

Outro alvo celular dos antígenos T de poliomavírus é a fosfatase PP2A (47). Essa fosfatase pertence à via de ativação da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK, do inglês mitogen-activated protein kinase) e é inativada por isoformas do antígeno T dos poliomavírus SV 40, JCPyV e MCPyV (46) de modo a impedir que membros relacionados a ativação desta via sejam desfosforilados. Por exemplo, foi observado que a interação de PP2A com o antígeno sT de SV40 está associada ao aumento dos níveis das ciclinas A e E, e à maior degradação da proteína P27 (48).

Mas a importância da relação entre humanos e poliomavírus é que quatro poliomavírus apresentam associação às doenças em humanos. MCPyV e o TSPyV estão associados ao CCM e à tricodisplasia espinulosa, respectivamente. O JCPyV está associado à Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP). Finalmente, o BKPyV está associado à disfunção crônica em pacientes com transplante renal, cistite, estenose uretral e nefropatia.

1.4. Poliomavírus de células de Merkel (MCPyV).

Em 2008 o quinto poliomavírus humano, o poliomavírus de células de Merkel (MCPyV), ou HPyV5 foi descrito em amostras de carcinomas de células de Merkel (19). Os autores, analisando amostras obtidas de 10 pacientes diagnosticados com CCM buscaram no RNA mensageiro o material para análise, tentando elucidar essa doença até então pouco conhecida. Usando a técnica chamada de subtração digital de transcritos (DTS, *digital transcriptome subtraction*), identificaram uma sequência que não apresentava semelhança ao banco de sequências de transcritos humanos. Ampliando a pesquisa na busca de identidade, mas desta vez usando banco de dados de nucleotídeos, os autores verificaram que a sequência estava relacionada às sequências do antígeno T do vírus linfotrópico do macaco verde (LPyV) e também com a do poliomavírus humano BK (BKPyV) (19)

O genoma viral foi amplificado pela técnica de *primer walking* e, posteriormente, sequenciado. Os resultados obtidos demonstraram que havia ocorrido um evento de integração do genoma viral na região 3p14.2 do genoma humano de tal maneira que foi possível sua expressão, mas de forma truncada. A análise feita em amostras de tecido primário e de metástase de um mesmo paciente demonstrou que o padrão de integração encontrado no tecido primário se repetia na amostra de tecido metastático. Deste modo a temporalidade dos eventos, integração e evolução da malignidade, foi definida. Este estudo determinou que 80% das amostras eram positivas para DNA do vírus, gerando o primeiro dado de prevalência do MCPyV nessa neoplasia. Desta maneira, esse trabalho, além de caracterizar o agente infeccioso, permitiu definir outras características deste vírus na evolução da doença carcinoma de células de Merkel. As sequências obtidas mostraram que o genoma viral havia se integrado ao genoma humano e que o evento de integração era anterior à expansão clonal e metastatização.

1.4.1. Biologia do MCPyV.

O MCPyV tem um genoma de 5387 pb organizado de maneira semelhante ao dos outros vírus da família. A organização do genoma do MCPyV é apresentada na figura 3.

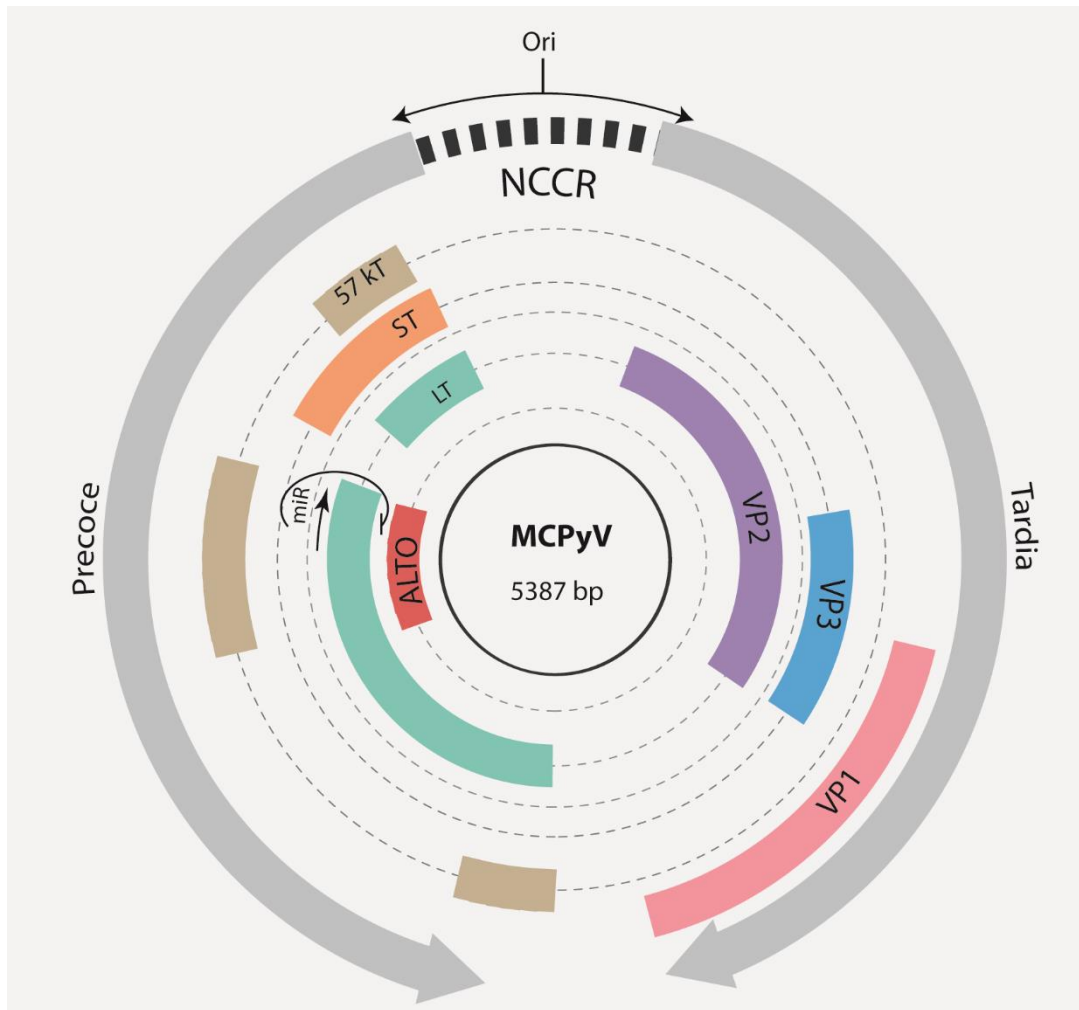


Figura 3: Genoma do MCPyV. Esquema representativo do genoma viral do MCPyV. O genoma é dividido em três regiões funcionais. Uma região não codificante (NCCR) que regula a replicação e transcrição virais, uma região precoce que contém os genes envolvidos na regulação do ciclo viral (antígenos sT, LT, 57kT, ALTO, miRNA), e uma região tardia que codifica as proteínas estruturais (VP1-3). As setas cinza indicam a direção da transcrição. Origem de replicação; ALTO, *Alternate frame of the Large T Open reading frame*; miR, microRNA.

Em 2013 foi demonstrada a existência de uma quinta ORF. Este gene se expressa a partir de um sítio de iniciação de transcrição alternativo localizado no segundo éxon do gene do antígeno T. A proteína codificada por este gene, denominada ALTO (do inglês *Alternate frame of the Large T Open reading frame* - fase alternativa de leitura do antígeno T maior) teria função acessória na replicação viral (66). Portanto as isoformas do antígeno T encontradas no MCPyV são denominadas de: antígeno T maior ou LT (do inglês, *Large T*), antígeno T menor ou sT (do inglês, *small T*), antígeno 57KT e a proteína ALTO (49), conforme figura 04.

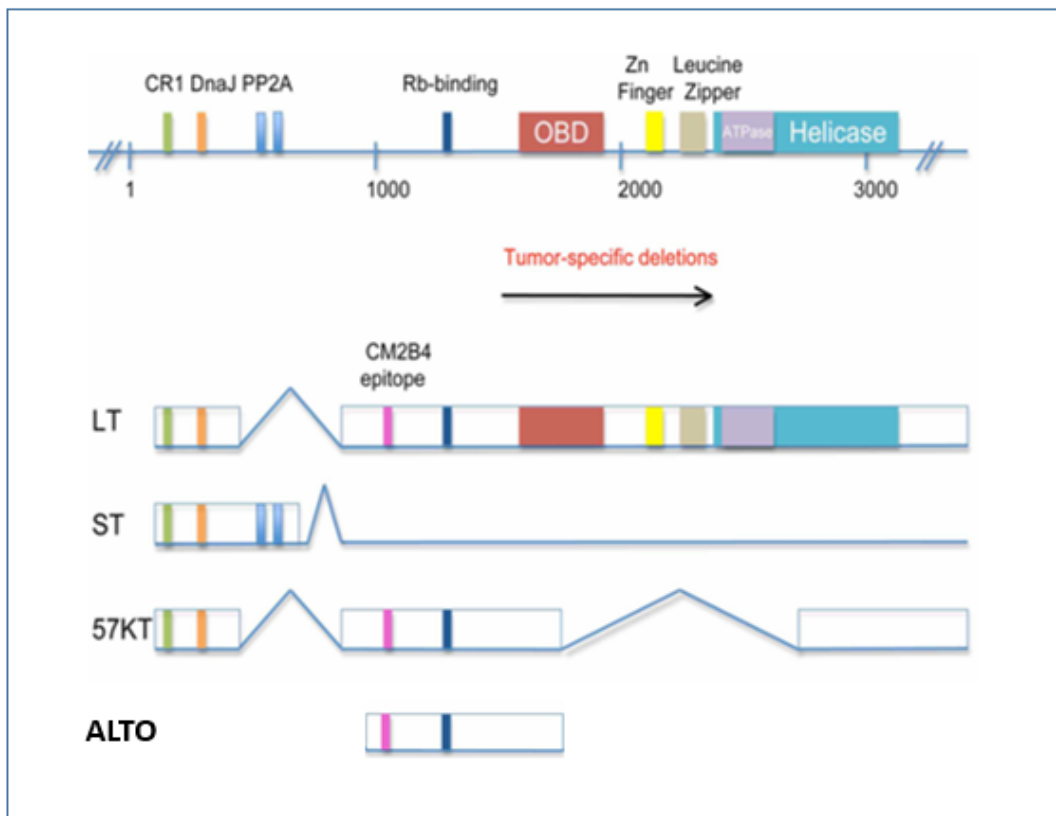


Figura 4: Região precoce e mRNA. Esquema da região precoce do MCPyV e dos mRNA resultantes de sua transcrição. Na parte superior é mostrado o *locus* que codifica o antígeno T do MCPyV. Embaixo, estão mostradas as diversas variantes de *splicing* que codificam as proteínas LT, sT, 57KT e ALTO. Os domínios funcionais específicos e a posição relativa no genoma viral estão indicados. Modificado (50).

É importante salientar que em células em cultura provenientes de isolados de CCM, MCPyV positivas, o silenciamento do antígeno T acarreta em interrupção do crescimento e indução de senescência, indicando um papel importante dessa proteína no processo de manutenção do fenótipo transformado (51). Diversos estudos demonstraram que os genomas de MCPyV detectados em tumores apresentam alterações na porção 3' do gene que codifica o antígeno T, mais precisamente a montante do domínio de helicase, a jusante da região do gene que codifica o antígeno sT (18,52,53,54,55). O acúmulo destas alterações, nesta porção do antígeno T, é uma etapa importante na carcinogênese mediada por esse vírus. Ao suprimir a replicação viral, ocorrerá uma diminuição da carga viral e assim consequentemente também uma menor chance de reconhecimento pelo sistema imune. Samini e colaboradores (56) descreveram essa perda do controle de proliferação como sendo a forma requerida para a sobrevivência da célula tumoral e que esse evento constitui a base para a oncogênese mediada por MCPyV. Desta forma a

capacidade replicativa fica comprometida permanecendo a expressão das isoformas do antígeno T, ou porções truncadas desta região, que ainda são expressas (57).

A forma truncada deste gene tem o domínio de ligação a proteínas celulares, como o domínio de ligação a pRB sempre preservados (56). O antígeno sT é composto por 186 aminoácidos transcritos a partir do primeiro éxon e nesta porção que está presente o sítio de ligação à fosfatase 2A. Esse sítio, conservado nos PyV, tem papel na transformação celular (60). Ainda na porção tardia do genoma de MCPyV é encontrado o gene que codifica para seu micro RNA. Por sua exata complementariedade ao antígeno T maior na porção 3' acredita-se que essa seria a forma de regulação da expressão desta proteína (61). Até o momento não tem sido descrito nenhum alvo celular sob influência deste microRNA viral.

Na região tardia do genoma são encontrados os genes que codificam as proteínas VP1, VP2 e VP3. A ausência de detecção da proteína VP3, em ensaios de expressão a partir da fase aberta de leitura específica de VP2 e VP3 e o fato que esta ausência não alterava a taxa de infectividade, medida por meio de ensaios *in vitro* sugerem que essa proteína não seja expressa ou que seja expressa apenas sob condições especiais (62). Na região não codificante do genoma de MCPyV, o destaque fica para uma sequência formada por oito repetições do pentanucleotídeo GAGGC responsável pela ligação ao antígeno T maior (63). Moens e colaboradores (64) descrevem a NCCR do MCPyV como a de maior taxa de expressão dentro dos HPyV, tanto para o promotor da região precoce como a tardia.

1.4.2. Epidemiologia do MCPyV.

O estudo da presença do MCPyV na população humana normal sugere que ele faz parte da microbiota da pele (65). O contato com o vírus ocorre logo nos primeiros anos de vida. Estudos sorológicos mostram positividade de 20% a 40% em crianças de até cinco anos de idade, atingindo uma positividade de 80% em indivíduos de mais de 50 anos (29,66,67,68,69,70,71). Dados obtidos em um estudo realizado em adultos bissexuais e homossexuais, que foram acompanhados a cada 6 meses nos EUA, descrevem a infecção primária como assintomática no momento da soroconversão. Além disso, esse estudo analisou a presença de sintomas tais como febre, brotoejas, diarreia e perda de peso bem como resultados de testes citológicos como contagens de eritrócitos, linfócitos, determinação da população linfocitária (CD4 ou CD8 positivos). No entanto, os resultados obtidos não permitiram separar os indivíduos soroconversores dos que não soroconverteram (70). A detecção de DNA de MCPyV na pele em casos de CCM é mais frequente (72), mesmo em locais distantes da lesão (53). O MCPyV pode ser detectado em sangue, sobranceiras, esfregaço ou aspirado nasal e mesmo em outros órgãos como glândulas adrenais (53,72,73,74,75). Em amostras de linfócitos isolados de pacientes alemães com leucemia linfocítica crônica (76) a positividade foi de 27% no grupo em estudo, mas a positividade encontrada para o MCPyV não apresentava relação com sinais clínicos. Além disso, no mesmo trabalho verificaram que a carga viral era muito inferior à observada em casos de MCC, confirmando os achados quando analisou mesmo tipo de amostra (77).

Muita discussão ainda existe sobre a forma de transmissão do MCPyV. Dados de sorologia familiar e soroconversão sugerem a hipótese para a transmissão por contato direto mãe-filho ou filho-filho, via pele ou por saliva (78). Alguns estudos relatam a detecção de MCPyV em amostras pulmonares referindo assim, à via aérea de transmissão (73). Outros pesquisadores utilizam dados de detecção do vírus em água de esgoto e também no trato digestivo, sugerem a via de transmissão fecal-oral (79).

1.5. A célula de Merkel.

As células de Merkel se localizam na camada basal nos epitélios da pele e mucosa oral de vertebrados, em contato direto com discos neuronais com função tátil. Estas células estão intimamente associadas a neurônios aferentes desmielinizados da derme (80) (Figura 5). Seu

produto de secreção atua como neurotransmissor, transformando o estímulo mecânico de pressão em potencial de ação nos neurônios.

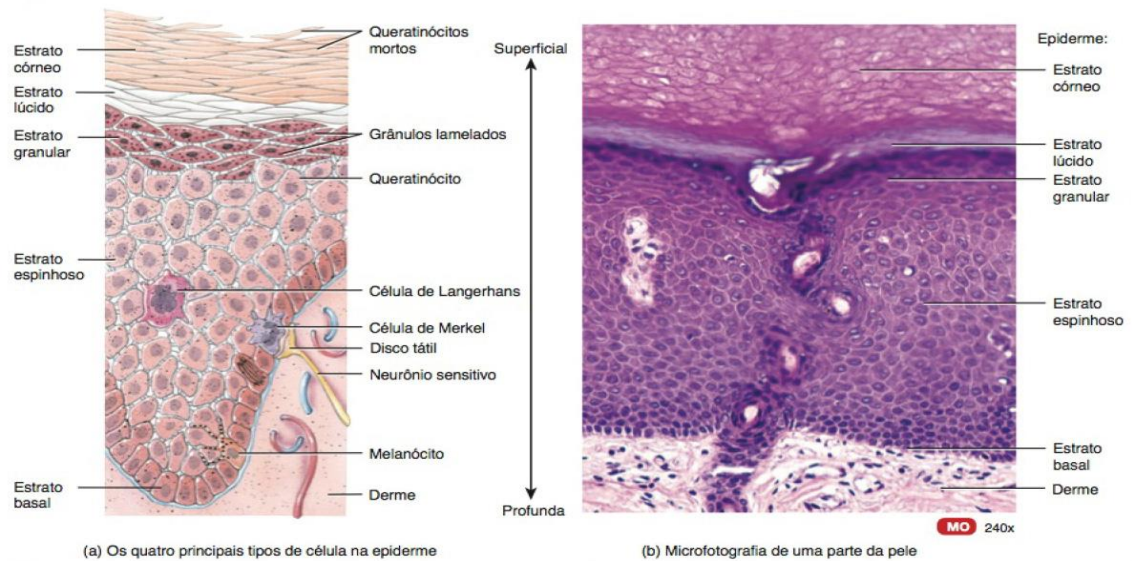


Figura 5: Pele em esquema e corte. Esquema ilustrativo e corte histológico de pele humana. Nas imagens podemos observar as muitas camadas do epitélio estratificado queratinizado. Na imagem da esquerda ilustra um epitélio o contato direto da célula de Merkel com neurônios sensitivos, presentes na faixa limítrofe entre a derme e a epiderme. Na imagem da direita, corte histológico corado pelo método de Hematoxilina e Eosina. Adaptado de Tortora e Nielsen, 2013(81).

O CCM é diagnosticado pela detecção de marcadores específicos deste tipo celular como, por exemplo, citoqueratina 20 e CD56 (82). No entanto, alguns autores sugerem que as células de Merkel não seriam o principal tipo celular infectado pelo vírus. Por exemplo, alguns autores sugerem outras possíveis origens deste tumor baseados em observações como: i) a ausência ou baixa taxa proliferativa das células de Merkel, (83); ii) a clara diferença entre a organização dos filamentos intermediários observada entre as células CCM e as células de Merkel (84,85); iii) a presença de casos com marcação positiva para citoqueratina 14; e iv) marcação positiva para marcador de celular de bulbo folicular, trouxeram a ideia de uma possível origem baseada em células tronco epidermais (86), trouxeram dúvidas sobre esse postulado. Também por marcadores específicos de expressão, TdT (deoxinucleotidil transferase terminal) e PAX5, também chamada proteína ativadora de células B (BSAP, do inglês *B-cell-specific activating protein*) foi proposto que a origem deste tumor seria a partir do sistema linfocitário, células pré-pró-B (87). Mais recentemente (88) propuseram que fibroblastos de derme seriam a célula onde a infecção produtiva teria início. Neste trabalho, usando sistemas de pseudovírus compostos pelas proteínas estruturais de MCPyV e genes que expressam proteínas fluorescentes, foi demonstrado que este vírus é capaz de infectar diferentes tipos celulares mas, que a sua replicação ocorreria apenas nos fibroblastos da derme (88). No entanto, em amostras clínicas nunca foram detectados componentes virais em células da derme adjacentes a CCM positivos para MCPyV (88).

A integração do genoma do MCPyV está diretamente associada à patogênese do vírus, uma vez que interrompe de forma definitiva o ciclo natural do agente (50,55). Esta observação é reforçada pelo fato de que até o momento não há relatos de CCM onde o vírus esteja apenas na forma episomal. O evento mais relatado é a interrupção do antígeno T na porção genômica que codifica a extremidade carboxi terminal da proteína, alterando seus domínios envolvidos na replicação (55,59,72). O antígeno T maior continuaria a ser expresso de forma truncada, ao tempo que a expressão do antígeno T pequeno não seria afetado.

Como todo poliomavírus o MCPyV é adquirido logo na primeira infância e permanece sem causar sintomatologia a menos que algum evento de imunossupressão ocorra. Para tanto, o MCPyV tem mecanismos de atuação nos componentes do sistema imune inato do hospedeiro evitando sua ativação e, desta maneira, impossibilitando a manifestação molecular indicativa desta infecção. Quadros de imunossupressão aumentam o risco para CCM em até dezesseis vezes (6). O antígeno T maior consegue alterar a resposta imune por meio da inibição do fator de transcrição C/EBP β e, conseqüentemente, da expressão do receptor tipo Toll 9 (89). Desta forma a célula fica incapaz de reconhecer a presença de moléculas de dupla fita de DNA não-metiladas em seu citoplasma (90) e permite ao vírus desregular a resposta imunológica do hospedeiro. No domínio codificado pelo éxon 2 do gene do antígeno T maior, existe uma região responsável pela ligação à proteína Vamp6. Essa proteína citoplasmática é sequestrada no núcleo inibindo sua função no tráfego de lisossomos (88). Além disso, dados indicam que a interação com essa proteína poderia estar envolvida no estabelecimento de latência viral (55).

Assim como outros vírus (Papilomavírus humano, Herpesvírus do Sarcoma de Kaposi e o Vírus da leucemia de células T humanas) o MCPyV também atua através da interferência em marcadores de superfície celular com o intuito de desregular o sistema imunológico do hospedeiro. Para tanto, umas das formas de desregular a resposta imunológica, o antígeno T menor atua via ligação à proteína NEMO/IKK- γ (NF- κ B *essential modulator*, modulador essencial de NF- κ B) alterando um importante mecanismo de controle da infecção viral, mediada pelo sistema imune inato (91). Outro marcador de superfície celular que é alvo das proteínas do MCPyV é o MHC de classe I. Casos de CCM MCPyV positivos quando comparados aos negativos apresentavam níveis de expressão das moléculas MHC classe I mais baixos facilitando a persistência das células tumorais (92). Além disso, o MCPyV promove expressão desregulada do ligante inibitório da resposta imune de morte programada nas células PD-1, agindo de maneira inibitória sobre os linfócitos T. Esse ligante inibitório, aparece aumentado em tumores CCM MCPyV positivos quando comparados com os tumores MCPyV negativos de tumores (93).

Apesar desta diferença, a terapêutica tem se beneficiado de moléculas inibitórias desta relação ligante - receptor, anticorpos monoclonais, em ambas situações de positividade viral (94).

1.6. Segunda neoplasia em pacientes com CCM.

Estudos realizados em diferentes populações têm demonstrado que pacientes diagnosticados com CCM apresentam risco aumentado para uma segunda neoplasia (1,95,96,97). Dentre estas segundas neoplasias, os tumores malignos de pele aparecem mais frequentemente associados, reforçando a influência da radiação UV na origem destes distintos tipos tumorais (97, 98), mas não de maneira exclusiva. Analisando casos de MCC e segunda neoplasia, Kaae (2010) (99) confirmaram a observação de segunda neoplasia de pele como sendo muito frequente, mas mostrou que leucemia linfóide crônica também acometia essa casuística de maneira elevada. Observaram que pacientes com MCC desenvolverem carcinoma escamoso de pele, com uma incidência em 14,6 % dos casos enquanto de leucemia linfóide crônica a incidência foi de 14,7 % (99). Em pacientes de CCM, a segunda neoplasia pode também ser um CCM (100-105). Um estudo realizado utilizando amostras de tecido primário de quatro casos de tumores de CCM em pacientes do estado de Michigan, EUA, caracterizadas por sequenciamento de nova geração mostrou que em dois casos os segundos tumores apresentavam um padrão tanto de sequências virais (Antígeno T e sT) quanto de sequências de alvos somáticos diferentes ao do primeiro tumor. Essa observação mostra que era possível a repetição do evento de patogênese mediado pelo MCPyV (102,106).

1.7. Os papilomavírus humano.

Os papilomavírus são vírus não envelopados com diâmetro de aproximadamente 50 nanômetros (nm), cujas partículas apresentam formato icosaédrico, com capsídeo composto por 72 capsômeros pentaméricos. O material genético é constituído de dupla fita de DNA contendo aproximadamente 8000 pb (107). A família *Papillomaviridae* é dividida em cinco gêneros: Alfapapilomavírus predominantemente detectado em epitélio de mucosa (108,109), Betapapilomavírus, Gamapapilomavírus, Mupapilomavírus e Nupapilomavírus sendo encontrados em tecidos cutâneos (108). O grupo dos Alfapapilomavírus ainda é subdividido em função das lesões associadas na cérvice uterina. Portanto, nesse grupo que infectam mucosa, alguns tipos (6,11,42 e outros) aparecem associados a lesões benignas do epitélio e lesões de baixo grau de cérvice uterina e são classificados como de baixo risco oncogênico. Por outro lado, os tipos 16, 18,

31, 51, 55, entre outros, apresentam atividade transformante *in vitro* e ocorrem com frequência predominante em lesões de alto grau de cérvix uterina e câncer de colo de útero, sendo classificados como tipos de alto risco oncogênico (107).

O número de novos isolados de HPV tem aumentado historicamente conforme surgem técnicas mais robustas de identificação. Atualmente temos um total de 198 genomas totalmente caracterizados depositados (PAVE- <https://pave.niaid.nih.gov/>, em 14 de junho de 2019). A classificação de um novo isolado viral, dentro das divisões taxonômicas da família, se faz por comparação da sequência nucleotídica do gene responsável em codificar a proteína estrutural L1 do vírus em análise. Isolados com identidade de sequência, nesse fragmento, menores de 60 %, entre 60 e 70 % ou maiores do que a 90 %, são definidos em novos gêneros, espécie e tipos, respectivamente (PAVE- <https://pave.niaid.nih.gov/>).

Assim como encontrado no HPyV o genoma do HPV é dividido em três regiões funcionais distintas e como nos HPyV, essas regiões apresentam fases temporais distintas de expressão. Assim, no HPV temos uma região precoce, onde usamos a letra E (“early”, do inglês precoce), região tardia L (do inglês, “Late”) e uma região controladora longa com função apenas controladora, chamada LCR (do inglês, “Long Control Region”). Diferentemente do encontrado no poliomavírus, apenas uma das fitas do genoma dos HPVs é responsável por toda a transcrição e num único sentido (107). Após a infecção, funcionalmente o vírus necessita replicar seu genoma e, portanto, os genes que são primeiramente expressos, ou precocemente expressos, codificam a produção de proteínas cuja função é promover sua transcrição e replicação. Na figura 06 temos uma representação do genoma de HPV.

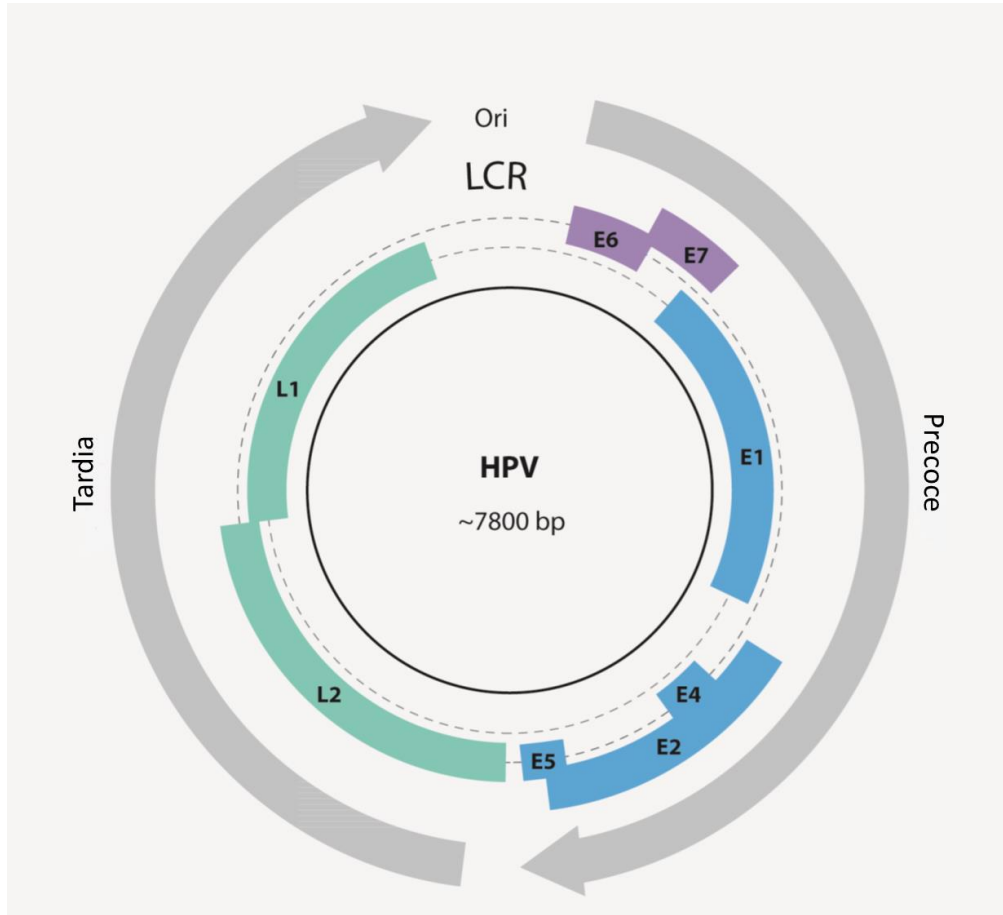


Figura 06: Genoma do HPV. Esquema representativo do genoma do HPV. O genoma do HPV também é dividido em três regiões funcionais. Uma região não codificante (LCR) que regula a replicação e transcrição virais, uma região precoce que contém os genes envolvidos na regulação do ciclo viral (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e uma região tardia com os genes L1 e L2, formadores do capsídeo viral. As setas cinzas indicam a direção de transcrição.

A região genômica viral que é expressa temporalmente a jusante é denominada de região tardia e codifica para a produção de proteínas envolvidas na montagem da partícula viral. Essas proteínas, L1 e L2 formarão o invólucro do material genético, ou também como é denominado, o capsídeo viral (107). O HPV é um vírus epiteliotrópico, sendo o queratinócito sua célula alvo. Desta maneira, alguma abrasão deve ocorrer para que o vírion tenha acesso a camada basal, local de sítio de sua célula alvo.

Uma vez que o vírus tenha infectado a célula, seu material genético se instala no núcleo e, a menos que ocorra um evento integrativo ao cromossomo, lá permanecerá na forma episossomal. A expressão das proteínas virais ocorre de acordo com a progressão natural das células no epitélio mas apenas ocorrerá em células que mantenham sua taxa proliferativa (110). Assim, conforme as células sofrem diferenciação emergindo para camadas mais superiores do epitélio, irá ocorrendo simultaneamente a expressão de diferentes proteínas virais. Esse processo culmina com a expressão das duas proteínas estruturais L1 e L2, (110), conforme demonstrado na figura 07.

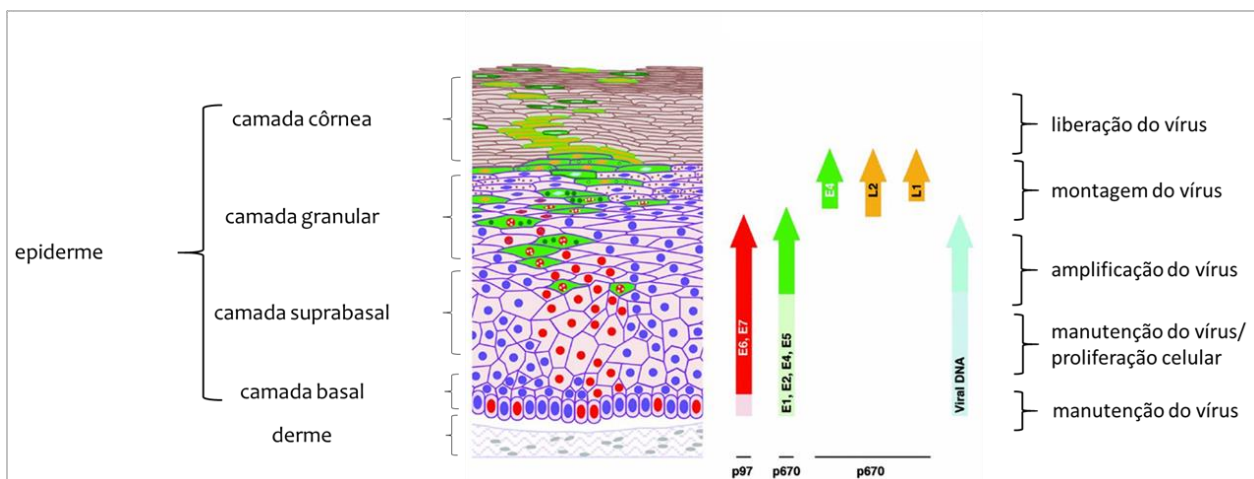


Figura 7: Epitélio estratificado e ciclo viral. Esquema mostrando a associação entre a estrutura do epitélio estratificado e o ciclo viral. O esquema mostra as diferentes camadas celulares do epitélio os genes virais expressos em cada uma delas. As setas diferenciadas por cores evidenciam as diferentes proteínas virais e no esquema do epitélio essas cores indicam a camada onde esta respectiva expressão ocorreria, modificado de (110).

Para ativar a maquinaria celular envolvida na replicação e também manter as células diferenciadas em constante divisão, é fundamental a interferência das proteínas virais E6 e E7. As proteínas E6 e E7 atuam em alvos cruciais para a manutenção celular. Uma delas denominada a proteína guardião do genoma, a p53 e a outra pRb, pelo seu envolvimento na neoplasia retinoblastoma, uma forma de câncer detectada em crianças. A proteína E6 de HPV de alguns tipos específicos atua na proteína celular p53 através de uma interação com outra proteína celular, a E6-AP. E6-AP ligada à E6 transfere uma molécula de ubiquitina a proteína p53 que, uma vez

marcada, entra na via da proteólise mediada por proteassoma, resultando em evento de proteólise. A proteína E7, por sua vez, atua na proteína celular pRb através de ligação tipo proteína-proteína. A proteína pRB ocorre como ligante de uma família de proteínas chamadas E2F que atuam na transcrição celular. Uma vez que pRb encontra-se ligado à proteína E7, o fator de transcrição celular E2F pode atuar livremente e efetuar sua função. Vários genes responsivos a E2F estão relacionados à progressão do ciclo celular (107).

1.7.1. Epidemiologia do HPV.

Os membros do grupo dos Papilomavirus infectam uma grande variedade de vertebrados. São encontrados em vários grupos de mamíferos, répteis e peixes. No grupo dos mamíferos, um grande número de hospedeiros já foi definido indo desde os grupos encontrados em humanos, até tipos que infectam animais aquáticos. Atualmente, (11 maio de 2019) 481 genomas completos de Papilomavírus constam anotados no banco de dados “PaVE”. Nome que representa o acrônimo de PAPILOMA com EPISTEME (PAVE- <https://pave.niaid.nih.gov/>), uma iniciativa do “Instituto Nacional de Doenças Infecciosas e Alergia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, NIAID – NIH” (111).

A infecção por HPV ocorre na pele muito cedo na vida do indivíduo. Estudos mostram que em crianças as taxas de detecção são de 70% à idade de 4 anos e essa taxa se assemelha muito à taxa dos respectivos pais das crianças analisadas (116). A forma de transmissão dos HPV é por contato direto, hipotetizado assim, serem os pais, ou familiares diretos, os transmissores na primeira infância (112). Na população assintomática aproximadamente 90% são portadores de DNA de Betapapilomavírus (113). A associação entre HPV e lesão de pele foi primeiramente estabelecida em pacientes com a condição Epidermodisplasia Verruciforme, uma doença autossômica recessiva extremamente rara e agressiva (114). Nesse grupo específico de pacientes, a infecção pelos tipos HPV5 e 8, é responsável por promover carcinomas de células escamosas em até 90% dos casos (115, 116). Alguns estudos mostram que os tipos de Betapapilomavírus, também chamados de HPVs “relacionados a EV” em referência a doença (Epidermo Displasia Verruciforme) e não os do tipo Alfacapilomavírus (cutâneos) aparecem mais associados ao câncer de pele não melanoma (117). Em um trabalho brasileiro a positividade para os papilomavírus nesse tipo de lesão, definido pela detecção de material genético por PCR, sem identificação dos tipos envolvidos, foi de 43 % (118). A associação entre HPV, irradiação solar e câncer de pele é também atribuída pela ativação da transcrição de genes virais em resposta a esse estímulo (119). Neste estudo, através de análises usando ensaio de gene repórter, verificou-se que ocorria um

aumento da transcrição na ordem de 1,7 e 2 vezes, para os tipos HPV5 e 8, em resultado ao estímulo com irradiação por UV-B. Assim, além do efeito imunossupressor a irradiação é capaz de ativar diretamente a transcrição dos vírus (120). No entanto, o estudo de CEC em indivíduos com diferentes biotipos mostrou que em negros estes tumores são mais comuns em áreas protegidas de irradiação solar. Além disso, foi observado que a maioria dos CEC presentes em áreas protegidas da irradiação UV em negros e hispânicos não brancos eram positivos para Alfa-HPV (121).

1.8. Polaridade celular .

A perda da polaridade celular e da arquitetura tecidual são características que definem a maioria dos carcinomas (122). Por análise de interactoma do antígeno sT do MCPyV, alguns alvos de interação foram evidenciados, entre eles, as proteínas CD44 e emerina. CD44 é uma proteína muito expressa em diferentes epitélios e regula a função de barreira epitelial estabilizando as junções do tipo de oclusão (123). A proteína do envelope nuclear, emerina, é um componente do complexo LINC que conecta a lâmina nuclear ao citoesqueleto de actina (124) e que regula a atividade da β -catenina, pela ligação e restrição a sua entrada no núcleo. No caso de HPV, a porção carboxi terminal da proteína E6 de alguns tipos, particularmente os tipos oncogênicos, apresenta um domínio de ligação a proteínas PDZ. As proteínas com domínio PDZ são, na maioria, proteínas envolvidas na regulação da polaridade celular. Entre elas temos os componentes principais do controle da polaridade celular como a proteína hDLG1 (human disc large homologue 1) (DLG1), SCRIB, a proteína PALS1, PATJ (também conhecida como INADL) e a proteína de membrana associada (MAGI1) e PAR3 que são essenciais para a integridade das junções do tipo de oclusão. A interação de E6 de HPV de alto risco oncogênico com estas proteínas foi observada e evidenciando a importância da perda da polaridade celular no processo de progressão tumoral (125, 126, 127, 128).

Pelo aqui exposto e por dados presentes na literatura, fica claro que MCPyV e HPV compartilham uma série de características como, por exemplo a alta prevalência de infecção em epitélios humanos (20,29); a expressão de proteínas que alteram alvos celulares cruciais no controle do ciclo celular (47,53,88); a integração no genoma humano, presente em tumores cutâneos, anterior à expansão clonal com expressão persistente de oncogêneses virais (18); e a capacidade de interferir na resposta imune inata do hospedeiro (91). No entanto, fatores como i) a prevalência de MCPyV em amostras de CCM; ii) a determinação das variantes de MCPyV presentes em tais amostras; iii) a prevalência da coinfeção por MCPyV e HPV em CCM; e iv) o efeito destes vírus na expressão de proteínas de polaridade celular, em amostras de CCM regionais, não têm sido estudados até o momento.

2 OBJETIVO

Caracterizar a prevalência e características filogenéticas do Poliomavírus de células de Merkel em amostras de carcinoma de células de Merkel e definir a taxa de co-infecção pelo HPV.

2.1. Objetivos específicos.

- Determinar a prevalência de MCPyV em CCM;
- Caracterizar molecularmente o vírus presente nessas amostras;
- Estabelecer árvores filogenéticas com as variantes encontradas no estudo;
- Verificar a taxa de co-infecção com HPV nas amostras de CCM;
- Analisar o padrão de expressão das proteínas relacionadas com a manutenção da polaridade celular e na transição epitélio-mesênquima.

3 MATERIAL E METODOS

3.1. Características das amostras em estudo.

O estudo foi realizado com amostras de 57 pacientes com CCM atendidos no AC Camargo Cancer Center, ou derivados a este centro que está localizado na cidade de São Paulo, Brasil. O conjunto analisado representa uma das maiores casuísticas desta neoplasia cuja incidência, conforme já mencionada, é muito baixa. Contribuem para o estudo amostras de tumores primários, metástases e recídivas de casos de carcinomas de células de Merkel. Todas essas amostras foram obtidas a partir dos pacientes com CCM. Foram incluídas no estudo 5 amostras de carcinomas escamosos de pele (CEC), 4 carcinomas basocelulares de pele (CBC), uma amostra de ceratose seborreica, uma verruga e um nevo melanocíticos (tabela 6), destes pacientes. As principais características dos casos e das amostras analisados estão detalhadas nas tabelas 2 a 5.

Tabela 2: Características da casuística. Gênero, idade dos casos no momento do diagnóstico e análises destes dados são apresentados em números absolutos e porcentagem.

	Casos (%) N=57	Idade (anos)	
		Média	Mediana
Masculino	28 (49,2)	58	71
Feminino	29 (50,8)	72,5	73

Tabela 3: Amostras incluídas no estudo. Todas as amostras são descritas quanto ao tecido de origem e sua participação numérica, absoluta e em porcentagem, na casuística. Notamos que temos diferentes tipos de tecidos e diferentes diagnósticos de lesões de pele, incluindo no tipo de lesões, CCM, CEC (carcinoma epidermóide), CBC (carcinoma basalóide), Ceratose seborreica, Nevo melanocítico e verruga que serão tratados como entidades histológicas.

Tipo de amostras de CCM	Número de casos	Total de amostras
Tumor primário:	31 (54,4)	37
Dois tumores primários:	1 (1,7)	2
Tumor primário e:		
- uma recidiva:	1 (1,7)	2
- duas recidivas	1 (1,7)	3
- uma metástase:	4 (7)	8
- duas metástases:	1 (1,7)	3
- uma metástase e amostra não CCM:	1 (1,7)	3
- uma amostra não CCM:	4 (7)	8
- duas amostras não CCM:	1 (1,7)	3
- três amostras não CCM:	1 (1,7)	4
Recidiva e amostra não CCM:	1 (1,7)	2
Metástase	6 (10,5)	6
Duas metástases:	2 (3,5)	4
Três metástases:	1 (1,7)	3
Uma metástase e amostra não CCM:	1 (1,7)	2
Total:	57 (100)	84

Tabela 4: Descrição dos tumores primários quanto a localização. Região anatômica, números de casos e porcentagem no grupo dos tumores primários são mostrados.

Localização do tumor primário	Número (%)
cabeça e pescoço:	17 (36,1)
membros superiores:	14 (29,8)
membros inferiores:	7 (14,9)
tronco:	6 (12,8)
glúteo:	3 (6,4)
Total	47 (100)

Tabela 5: Entidades histológicas. Outros tecidos relacionados a pele de pacientes CCM de nossa casuística que foram analisados, seu número e porcentagem na formação do grupo.

Tipo de amostra	N (%)
CEC:	5 (41,7)
CBC:	4 (33,3)
Ceratose seborréica:	1 (8,3)
Nevo melanocítico:	1 (8,3)
Verruga:	1 (8,3)
Total	12 (100)

CEC - carcinoma epidermóide

CBC - carcinoma basalóide

3.2. Extração de DNA a partir de amostras parafinadas.

O DNA foi extraído a partir de amostras tumorais emblocadas em parafina segundo protocolo descrito por Shi e cols. (129) com modificações. Resumidamente, cortes obtidos a partir dos blocos de parafina foram dispostos em microtubos de centrifuga de 1,7 mL. A parafina foi totalmente removida por tratamento do material com Xilol. Foram efetuadas duas etapas que consistiram de homogenizações em agitador do tipo vortex após a adição de 1,0 mL de Xilol 100 % em cada vez. Em seguida foi realizada a digestão com Proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) conforme instrução do fabricante. Esse passo de digestão foi efetuado em banho a 56 ° C até total digestão do tecido. Cada microtubo de centrifuga, contendo o tecido, foi acrescido de 500 µL de solução de Lise seguindo o descrito por Shi e cols. (2002). Nesta solução, Tris-HCl 10 mM pH8,0; EDTA 1mM pH 8,0; SDS 1% e Proteinase K 1mg/ mL, adicionamos Proteinase K (0,4 % final), se após 12 horas o tecido não estivesse totalmente digerido. Após essa digestão, foi realizado uma etapa de extração orgânica utilizando o reagente “ULTRAPURE™ Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol” (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) O DNA contido na fase aquosa resultante foi precipitado utilizando acetato de sódio e etanol 100 % durante 18 horas a temperatura de -20 ° C. O pellet foi coletado e lavado com etanol 75 % por centrifugação e ressuspensão em água purificada estéril. A concentração do DNA foi determinada pela absorvância à

3.3. Detecção de MCPyV por PCR.

Uma vez que nosso objetivo era determinar a presença do genoma viral, através da detecção de produto amplificado deste material genético isolado, nos tecidos de MCC do estudo, a validação da qualidade deste material foi considerada um processo muito importante. O amplicon gerado para o fragmento do gene da beta globina humana utilizando os iniciadores PCO3 (5' - ACACAACCTGTGTTCACTAGC - 3') e PCO4 (5' - ACACAACCTGTGTTCACTAGC - 3'), conforme (130) foi o padrão de qualidade usado para validar a presença de material genético. Para detecção do DNA viral foram usados iniciadores para os genes L, VP1 e/ou reamplificação desses produtos utilizando os iniciadores descritos por Feng e colaboradores (19) e outros que foram propostos conforme listados na tabela 6 e esquematizados na figura 8. Considerando que a integridade do DNA extraído pode alterar o resultado da reação de detecção foram desenhados e sintetizados iniciadores para diferentes porções do gene do Antígeno T. O iniciador M3, complementar com a posição 1807 do genoma do MCPyV do isolado MCC 350 (GenBank EU375803) e quando utilizado em conjunto com M1 geraria um fragmento de 100 pb, menor que o fragmento (110 pb) utilizado para controle da qualidade do DNA. O par LT3-103 amplifica a região 684 - 787 do mesmo genoma MCC 350. A ferramenta “online” OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies – IDT/ <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>), foi utilizada para desenho dos iniciadores.

Tabela 6: Lista de iniciadores Iniciadores utilizados e suas sequencias.

Iniciador	Sequencia 5' - 3'
LT1-F	TACAAGCACTCCACCAAAGC
LT1-R	TCCAATTACAGCTGGCCTCT
LT3-F	TTGTCTCGCCAGCATTGTAG
LT3-R	ATATAGGGGCCTCGTCAACC
LT3-103-F *	GGAAAGTTTTGACTGGTGGC
LT3-103-R *	CTAATACTTACAGAGGAAGG
VP1-F	TGGATCTAGGCCCTGATTTTT
VP1-R	TTTGCCAGCTTACAGTGTGG
M1	GGCATGCCTGTGAATTAGGA
M2	TTGCAGTAATTTGTAAGGGGACT
M3 *	ATAGTGCAGAAGGTAGAGC

* iniciadores desenhados nesse estudo

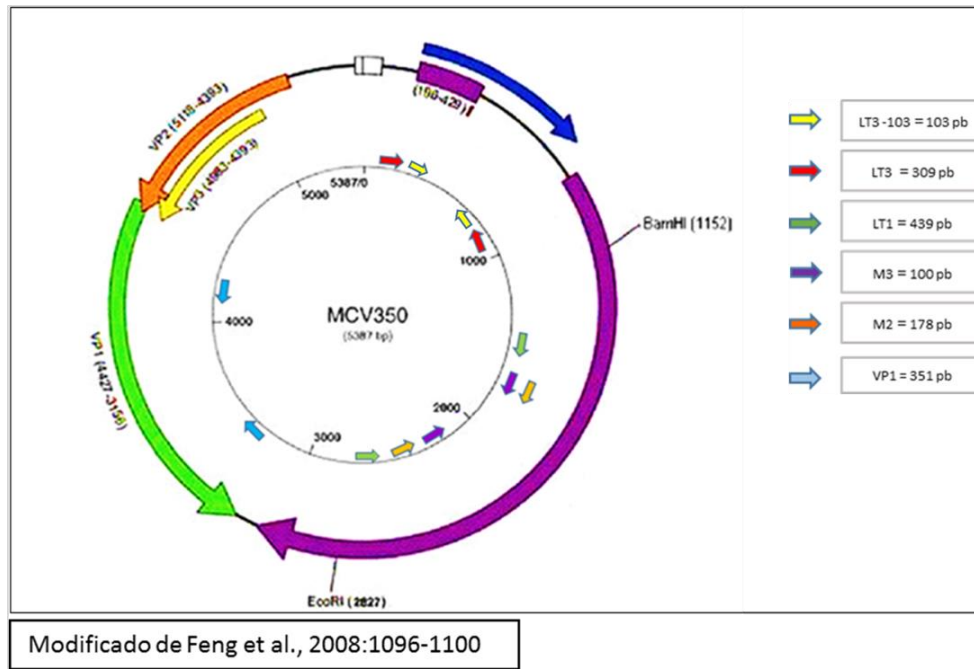


Figura 8: Esquema representativo do genoma de MCPyV e as posições dos pares de iniciadores. Na imagem a posição aproximada dos iniciadores no genoma de MCPyV é mostrada e ao lado o tamanho do amplicon esperado em pares de bases (pb).

Como controle positivo da reação de beta-globina foi utilizado DNA isolado de cultura das linhagens celulares HeLa ou SiHa na concentração de 10 ng/mL. Para servir de controle positivo de amplificação de alvos do MCPyV, foi adquirido da Addgene (Cambridge, MA, EUA), o plasmídeo pMCv-R17a (código #24729). Esse plasmídeo contém o genoma completo do MCPyV, número de acesso no GenBank KF266963, no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, NCBI – NIH. O plasmídeo pMCV-R17a, foi recebido na forma de linhagem bacteriana transformada. As bactérias foram plaqueadas em LB ágar contendo antibiótico de seleção Canamicina a 50 µg/mL, uma colônia isolada foi expandida em meio LB líquido com antibiótico e extraímos o plasmídeo por kit “GenElute Plasmid Miniprep Kit” (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) conforme instruções do fabricante.

3.4. Detecção de HPV por PCR.

Para a detecção de HPV optou-se pelos iniciadores GP5/6+ (131) sem alterações no protocolo original.

3.5. Coloração de gel de acrilamida.

De acordo com Sanguinetti e colaboradores (132) os produtos de PCR foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 8 % e corados pelo método de impregnação pela prata, com algumas modificações. Resumidamente foi realizada uma fixação inicial do gel por 15 minutos em uma solução de 10% de etanol e 0,5% de ácido acético, acrescida de 0,2% de nitrato de prata. Após 10 minutos o gel foi lavado em água destilada e deionizada por 2 minutos e revelado em 3,0% de NaOH e 0,1% de formaldeído, em água destilada e deionizada. Após a coloração, os géis foram fixados por 15 minutos em solução de fixação.

3.6. Sequenciamento pelo método de Sanger.

Os produtos de PCR e os plasmídeos de interesse obtidos foram sequenciados utilizando o “BigDye Terminator kit” (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), conforme instruções do fabricante. Produtos de PCR foram submetidos a marcação utilizando os mesmos iniciadores da PCR enquanto que para os produtos clonados utilizamos iniciadores M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG) e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) que são complementares ao plasmídeo. Os resultados de sequenciamento com iniciadores F e R eram alinhados, comparados e utilizados para gerar uma sequência consenso. Para isso, utilizamos o programa Bioedit versão 7.0.5, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, EUA.

3.7. Análise filogenética das amostras.

Para construção das árvores e inferências filogenéticas foram comparadas as sequências obtidas as disponíveis no banco de dados do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, NCBI – NIH NCBI, através do programa “MEGA 7”, Molecular Evolutionary Genetics Analysis (<http://www.megasoftware.net/>). Usamos o método de máxima parsimonia para construção das árvores com utilização da técnica de agrupamento de vizinhos onde foram testados 1000 bootstraps.

3.8. Tipagem de Alfa e Betapapilomavírus por “Luminex.”

A tecnologia Luminex foi utilizada para detectar Alfa e Betapapilomavírus. Resultados com Betapapilomavírus mostraram que esta é mais sensível para a detecção de HPV em amostras clínicas em comparação com metodologias baseadas em hibridação reversa (133), sendo adequada para aplicações diagnósticas e estudos epidemiológicos. As reações de amplificação foram realizadas como previamente descrito (21) utilizando uma mistura de iniciadores específicos para a amplificação de um fragmento do gene E7 de 21 tipos de Alfapapilomavírus ou 37 tipos de Betapapilomavírus. As reações para esses tipos virais diferem, são separadas e realizadas por gênero. Os produtos de PCR podem variar em tamanho, de 186 a 280 pb. Dois iniciadores para a amplificação de β -globina foram adicionados para proporcionar um controle positivo de qualidade do DNA alvo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit QIAGEN Multiplex PCR (Qiagen Venlo, Países Baixos) de acordo com as instruções do fabricante. A presença e o tamanho dos produtos de PCR foram verificados sistematicamente em géis de agarose.

Após amplificação por PCR, 10 μ l de cada reação foram analisados pela tecnologia Luminex para genotipagem de HPV como descrito (133). Resumidamente, os produtos de PCR gerados foram desnaturados e hibridizados, em placas de 96 poços, com sondas acopladas a esferas de polipropileno. Após a transferência dos produtos, por lavagem com filtro no fundo, o DNA não hibridizado foi removido. Subsequentemente, os produtos de PCR biotinilados serão corados com um conjugado de estreptavidina-R-ficoeritrina e depois as esferas foram analisadas no leitor Luminex 200. Os resultados serão expressos através da intensidade de fluorescência média (MFI) de pelo menos 100 esferas do analíto.

Para cada sonda, os valores de MFI obtidos, quando nenhum produto de PCR é adicionado à mistura de hibridação, foram considerados os valores de fundo. O corte foi calculado adicionando 5 MFI para 1.1X o valor de fundo mediano.

3.9 Detecção e tipagem de HPV por “INNO-LIPA”.

A tipagem foi realizada pelo kit “INNO-LIPA HPV Genotyping test” (Fujirebio, Tóquio, Japão), conforme instruções do fabricante. Resumidamente esse método se baseia no reconhecimento do material genético de uma ampla gama de tipos de Alfapapilomavírus por hibridização em tiras de nitrocelulose onde se encontra imobilizadas sequências de tipos determinados de Alfapapilomavírus. A amplificação por PCR utiliza os iniciadores SPF10 conjugados conforme instruções no manual. Com a utilização deste kit é possível se determinar a presença de 28 tipos de Alfapapilomavírus.

3.10. Reação de imuno-histoquímica.

As reações de imuno-histoquímica (IHQ) foram realizadas utilizando o equipamento automatizado Ventana, marca Ventana, (Ventana Medical Systems, AZ, EUA). As amostras foram submetidas a reação de marcação, pelo anticorpo em análise, como estratégia de visualizar alterações no padrão de expressão dessas proteínas. Para todas as reações e anticorpos foram incluídas lâminas controle. Como controle positivo foram utilizadas lâminas com cortes de tecidos seguindo orientação do fabricante do anticorpo primário ou conforme orientação do patologista. Como controle negativo foram utilizadas lâminas semelhantes na ausência do anticorpo primário. Em uma etapa anterior à marcação, todas as lâminas do conjunto, foram identificadas através de sistema de código de barras em etiquetas específicas deste equipamento. Todas as reações utilizaram o protocolo composto por: recuperação antigênica de 60 minutos utilizando a solução de recuperação antigênica 1 (CC1 do inglês, “cell conditioning 1”, código 950-124) marca Ventana, (Ventana Medical Systems, AZ, EUA), seguido da incubação por 32 minutos com o

anticorpo primário diluído (detalhes com anticorpo - tabela 07) em solução diluente específica para anticorpos (ref. 251-018) marca Ventana (Ventana Medical Systems, AZ, EUA). Completando a reação de marcação uma etapa, também composta por um período de 32 minutos utilizando o reagente Hematoxilina II (ref. 790-2208) foi seguida pela etapa de 4 minutos com o reagente “Bluing” (ref. 790-2037), marca Ventana, (Ventana Medical Systems, AZ, EUA).

Com a reação de marcação terminada as lâminas foram preparadas para montagem final. Foram usadas cinco lavagens com etanol 100 % para desidratação e duas com Xilol 100 % para preparo da montagem, sendo que cada lavagem era composta de dez episódios de imersão instantânea antes da troca para a próxima repetição.

Tabela 7: Descrição das condições de reação de Imuno-histoquímica. Aparecem descritos os anticorpos usados, seus fabricantes, códigos de catálogo, suas diluições de uso e o respectivo controle positivo utilizado.

Anticorpo	Fabricante	Código	Diluição	Positivo
E-caderina	Santa Cruz Biotechnologies	S.C.:8426	1/100	Pele normal
Vimentina	Santa Cruz Biotechnologies	S.C.: 66002	1/1000	Pele normal
Snail	Abcam	AB:85936	1/200	Carcinoma ductal de mama

SC: Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, EUA); AB: Abcam (Cambridge, Inglaterra)

3.11. Clonagem dos produtos de PCR.

Para as amostras enviadas a clonagem, seus produtos de PCR de interesse foram ligados ao vetor pCR[®] 2.1-TOPO, material constituinte do “TA-TOPO cloning kit”, código K450002 (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) conforme instruções do fabricante.

3.12. Obtenção de bactérias competentes.

Uma adaptação da técnica descrita por Hanahan (134) foi utilizada na obtenção de bactérias competentes. A partir de uma colônia isolada de *E. coli* (cepa JM109) obtida de uma placa recente de LB ágar, 2 mL de meio LB foi inoculado para então ser incubado sob agitação constante a 37°C por aproximadamente 2 horas. Este pré-inóculo foi transferido para 50 mL de meio LB acrescido de 0,5 mL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) 1M e mantido por cerca de 3 horas, nas mesmas condições de agitação e temperatura para que atingisse DO 600 nm entre 0,5 e 0,6. Ao atingir o ponto desejado, o frasco contendo a cultura foi então transferido para um recipiente com gelo. A cultura foi transferida para tubos de polipropileno previamente resfriados e mantidas em repouso por 15 minutos. A cultura foi então sedimentada por centrifugação durante 12 minutos, a 4°C e 3000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi gentilmente ressuspensionado em 10 mL de solução RF I (100 mM KCl; 50 mM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 30 mM de acetato de potássio; 10 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 15% glicerol; pH 5,8), e mantido em gelo por 15 minutos. As bactérias foram novamente centrifugadas a 3000 x g por 12 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e a cultura foi ressuspensionada em 2 mL de solução RF II (10 mM Na-MOPS; 10 mM KCl; 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 15% glicerol; pH 6,8). A suspensão obtida foi distribuída em alíquotas de 120 μ L por microtubo e mantida até o momento de sua utilização.

3.13. Transformação de bactérias competentes.

Aliquotas de bactérias competentes mantidas a -80°C foram descongeladas em gelo por 15 minutos. Para cada 50 μ L de cultura competente, foram suplementados com 5 μ L do DNA de interesse. Esta mistura foi mantida por 30 minutos em gelo, e então submetida a choque térmico por 1,5 minutos a 42°C e, em seguida mantidos por mais 5 minutos em gelo. Após este período, todo o volume foi transferido para um microtubo de centrifuga contendo 500 μ L de meio LB. Esses tubos foram mantidos a 37°C por 1 hora, sob agitação de 200 rpm e tiveram os transformantes coletados por meio de centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado de maneira que apenas restassem 100 μ L que foram plaqueados em meio LB

acrescidas com ampicilina à 100 µg / mL. As placas foram incubadas por 37°C por 16 horas para crescimento dos clones positivos.

3.14. Isolamento dos plasmídeos.

Clones bacterianos contendo plasmídeo de interesse foram crescidos em 5 mL de meio LB, suplementado com ampicilina à 100 µg / mL, por 16 - 18 horas em incubadora a 37 °C com agitação constante de 200 rpm. Após essa etapa foi usado o Kit “GenElute Plasmid Miniprep Kit”, código PLN350 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), conforme instruções do fabricante.

4 RESULTADOS

Para a validação da extração de DNA de boa qualidade que posteriormente seria usado para amplificação usamos a amplificação de um fragmento do gene da beta microglobulina humana. De todas as amostras analisadas, apenas cinco necessitaram de uma segunda extração para que tal validação fosse obtida. Destas cinco, uma ainda persistiu negativa, mas pelo fato de ter amplificado a banda de interesse do MCPyV, seu material foi considerado adequado para análise.

4.1. Padronização do protocolo de detecção.

Para que iniciássemos a etapa de determinação da prevalência de MCPyV em MCC por PCR de maneira robusta, realizamos uma etapa de padronização da reação de PCR. A partir da temperatura de pareamento teórica obtida da ferramenta OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies – IDT/ <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) diferentes condições de reação foram testadas. Essas variações visavam determinar as melhores condições de amplificação do gene alvo e foi usado o resultado obtido da amplificação do plasmídeo controle positivo, como “padrão ouro”. Nestes testes definimos as melhores condições de PCR, conforme demonstra a tabela 8.

Tabela 8: Condições para uso na PCR do MCPyV. São apresentadas as condições de PCR estabelecidas para os diferentes pares de iniciadores, como concentração de iniciadores, temperatura de anelamento e concentração de cloreto de magnésio

INICIADORES			
PAR	[]	Temp. de anelamento	[] de Magnésio
LT1F – LT1R	0,15 µM	60 °C	1,5 mM
M1 – M2	0,15 µM	55 °C	1,5 mM
M1 – M3	0,15 µM	58 °C	1,5 mM
LT3F – LT3R	0,15 µM	58 °C	1,5 mM
LT3F – LT3R 103	0,15 µM	50 °C	2,0 mM
VPIF – VPIR	0,15 µM	58 °C	1,5 mM

4.2. Padronização das reações de PCR.

Em uma etapa de otimização das reações de PCR onde foram definidas: i) concentração de iniciadores; ii) temperatura de pareamento e iii) concentração de cloreto de magnésio, para os diferentes pares de iniciadores, realizamos uma etapa de escolha de iniciadores. Os resultados apresentados na Tabela 8, que representa um estudo piloto realizado com 10 amostras, mostram que a detecção de DNA do vírus MCPyV variou conforme as condições utilizadas. Neste conjunto de amostras não foi avaliado a condição LT3-103. A condição de PCR utilizando os iniciadores LT3 nas duas reações permitiu a detecção deste vírus em 70% das amostras testadas. Dados semelhantes de frequência de detecção utilizando o iniciador LT3 foram obtidos em um trabalho realizado em com amostras de uma população alemã (42). Neste trabalho os autores sugerem que a diferença de capacidade de amplificação dos iniciadores seria determinada por mutações ou deleções no genoma viral resultantes da integração do mesmo no genoma humano. Desta maneira essa foi a condição de reação utilizada para a detecção de MCPyV nas amostras analisadas e encaminhadas para determinação da sequência deste fragmento. Outro fragmento que também foi encaminhado para determinação da sequência nucleotídica foi o obtido pelos iniciadores VP1. Além disso, buscando verificar a influência que teria o tamanho do amplicon na taxa de detecção de presença viral, foi sintetizado um par de iniciadores para um amplicon menor, dentro da região LT3 do antígeno, iniciadores descritos na tabela 9. Assim, repetimos a determinação da prevalência analisando o grupo de negativos. Essa foi a condição escolhida para definir positividade e prevalência viral de MCPyV em MCC.

Tabela 9: Iniciadores. Iniciadores utilizados, tamanho de fragmento esperado e porcentagem de positividade por PCR. O resultado do teste de padronização é apresentado. Um subgrupo de dez amostras foi analisado por um conjunto de iniciadores. Na tabela a positividade foi designada por sinal “+” e as porcentagens aparecem na linha inferior.

Amostra	LT1	M1M2 (*)	M1M2	M1M3 (*)	M1M3	LT3	LT3 (*)	VP1
1	-	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+	-
4	-	-	-	+	+	+	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	-	-	+	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	+	+	-
10	+	+	-	+	+	+	+	-
Total %	20	50	20	40	50	60	70	30

(*) NESTED-PCR. Fragmentos obtidos da amplificação com os pares: LT1 - 439 pb; M1-M2 - 178 pb na reação PCR ou NESTED-PCR; M1-M3 - 100 pb na reação PCR ou NESTED-PCR; LT3 - 309 pb na reação PCR ou NESTED-PCR e VP1 - 351 pb.

4.3. Determinação da prevalência de MCPyV.

No presente estudo foram analisadas 84 amostras histológicas provenientes de 57 pacientes com CCM. Dessas, 72 amostras eram originárias de CCM primários, recidivas ou metástases (Tabela 3). As 12 amostras restantes não correspondiam a CCM e foram descritas na tabela 5. Apenas três casos de tumores primários para CCM foram negativos para o DNA do MCPyV. Dessa maneira, a prevalência desse agente em nossa casuística foi de 94,8% com a utilização dos iniciadores LT-103. Vale a pena salientar que algumas amostras de metástase de CCM e de outras entidades histológicas (CEC e CBC) também foram negativas para o vírus (tabela 10). Dentre as cinco amostras CEC, apenas duas foram positivas para MCPyV (40 %), enquanto que em CBC das quatro amostras, três foram positivas (75%). Interessantemente, várias amostras não derivadas de CCM incluindo 2 CEC, 3 CBC, 1 nevo melanocítico, uma ceratose seborreica e uma verruga foram positivas para o agente. É importante salientar que um paciente apresentou um CCM primário positivo para o vírus, 1 CEC positivo para DNA de MCPyV e 2 CEC negativos para o agente. Duas amostras, as amostras de ceratose seborreica e a de verruga, são provenientes do mesmo paciente. Das doze amostras de outras entidades histológicas quanto a local de ocorrência é que, cinco amostras tiveram localização na área de cabeça e pescoço, três amostras em membros inferiores, uma amostra no tronco. Duas não tínhamos a informação registrada.

Tabela 10: Amostras negativas para MCPyV. A descrição do tecido de origem das amostras negativas.

Tipo de amostra	N
Primário CCM	3
Metástase CCM	2&
CEC	3*
CBC	1

*2 CEC provenientes do mesmo paciente; & provenientes do mesmo paciente.

4.4. Caracterização molecular dos fragmentos LT3.

Obtivemos 47 amostras positivas para DNA de MCPyV que tiveram o produto de PCR encaminhado para sequenciamento. Todos foram analisados em ambas direções utilizando os iniciadores LT3. A título de validação da metodologia de amplificação, nenhum produto diferente do esperado para esse fragmento foi identificado. Através do sequenciamento foram encontradas quatro variantes moleculares no fragmento analisado, sendo uma delas a sequência do vírus protótipo. As variantes descritas aqui serão definidas pela posição nucleotídica em que ocorre a alteração no fragmento analisado e não pela posição no genoma viral completo. As variantes encontradas foram: i) 44 T/A, ii) 49 T/C e iii) 127 G/A. A análise destas sequências mostrou que as variantes apresentavam alterações nucleotídicas que levaram a substituições silenciosas em todos os casos. A variante mais prevalente em nosso estudo foi a protótipo presente em vinte e nove (29) pacientes. Além disso, encontramos duas variantes ambas em dois (02) pacientes cada; 44 T/A e 49 T/C. Finalmente, a variante 127 G/A foi encontrada apenas em uma (01) amostra (Tabela 11). Os demais casos não identificados pela técnica de sequenciamento direto foram encaminhados para clonagem e posterior sequenciamento dos clones. Infelizmente não foram obtidos clones positivos e definimos que esses casos ficaram categorizados com positivos não identificados.

Tabela 11: Variantes de MCPyV em LT3. Variantes moleculares definidas no fragmento LT3 e suas prevalências nas amostras do estudo.

Variante	Prevalência N (%)
protótipo	29 (87,9)
44 T/A	2 (6)
49 T/C	2 (6)
127 G/A	1 (3)
Total	33 (100)

n.i. = não identificados, cinco amostras

4.5. Caracterização molecular dos fragmentos de VP1.

Das amostras submetidas à reação de PCR com iniciadores para o fragmento VP1 apenas 24 amostras geraram amplicons específicos. Assim, como observado em (42) a positividade para o fragmento do gene VP1 foi menor (34,6%) do que a positividade para o fragmento LT3 (48,3%). Algumas características observadas nos resultados de ambos fragmentos analisados foram comuns. Por exemplo, a alta conservação encontrada nas sequências das diferentes variantes e a presença de amostras onde a metodologia não foi capaz de determinar a sequência nucleotídica. Também no caso do fragmento VP1 identificamos apenas três variantes moleculares e a sequência do protótipo. As variantes detectadas foram: i) M-U8, ii) 190 T/C e iii) 223 A/G. A variante mais prevalente foi a M-U8 presente em dez (10) pacientes. A sequência protótipo foi detectada em oito (8) amostras. A sequência 190 T/C foi detectada em um paciente ao tempo que a variante 223 A/G foi detectada em apenas uma amostra, de um paciente conforme a tabela 12.

Tabela 12: Variantes de MCPyV em VP1. Variantes moleculares definidas no fragmento VP1 e suas prevalências nos pacientes do estudo.

Variante	Prevalência N (%)
protótipo	8 (40)
M-U8	10 (50)
MK907911	1 (5)
MK907910	1 (5)
total	20 (100)

n.i. = não identificado, quatro amostras.

Analisando diferentes clones gerados de amplificação do fragmento de VP1, foi identificado uma sequência ainda não identificada. Esta apresentava as alterações 155 A/G – 175 C/T – 265 A/G – 272 C/A. Os demais casos não identificados pela técnica de sequenciamento direto foram encaminhados a clonagem e posterior sequenciamento dos clones. Infelizmente não foram obtidos clones positivos e definimos que esses casos ficaram categorizados com positivos não identificados. As novas variantes do fragmento VP1 de MCPyV, encontradas em nossas amostras, foram depositadas no banco de dados do NCBI. As sequências receberam número de acesso MK907909, MK907910 e MK907911 e representam as sequências que anteriormente

descreviam as alterações encontradas nas posições 155 A/G – 175 C/T – 265 A/G – 272 C/A; 223 A/G e 190 T/C, respectivamente.

4.6. Análise filogenética das variantes de MCPyV.

Para fins de análise e posterior criação de uma proposta evolutiva que pudesse esclarecer a origem das variantes de MCPyV, na forma de uma árvore filogenética, comparamos as sequências aqui obtidas com as disponíveis no NCBI. Nessa comparação, a variação da sequência nucleotídica, na forma de descrição da variante molecular e a sua região geográfica de isolamento, foram usadas para propor uma relação de origem evolutiva. Para tanto, geramos um banco de dados com as sequências relacionadas a estes fragmentos disponíveis no banco de dados do NCBI e as identificadas em nosso estudo. É importante salientar que sequências obtidas a partir do fragmento VP1 têm maior número de depósitos, no banco de dados do NCBI, que as sequências obtidas a partir do fragmento de LT3. Assim, alguns fragmentos muito relevantes geograficamente, por serem da América do Sul, contribuíram somente com sequências do fragmento VP1.

4.6.1. Análise filogenética do fragmento LT3.

Para o fragmento LT3 optamos por compor nosso banco de análise apenas com variantes para as quais foi depositado o genoma completo e existia informação geográfica. Pela topologia de distribuição das amostras do nosso estudo pela árvore proposta para o fragmento LT3, não podemos notar um padrão único baseado na região geográfica de origem das mesmas, figura 9.

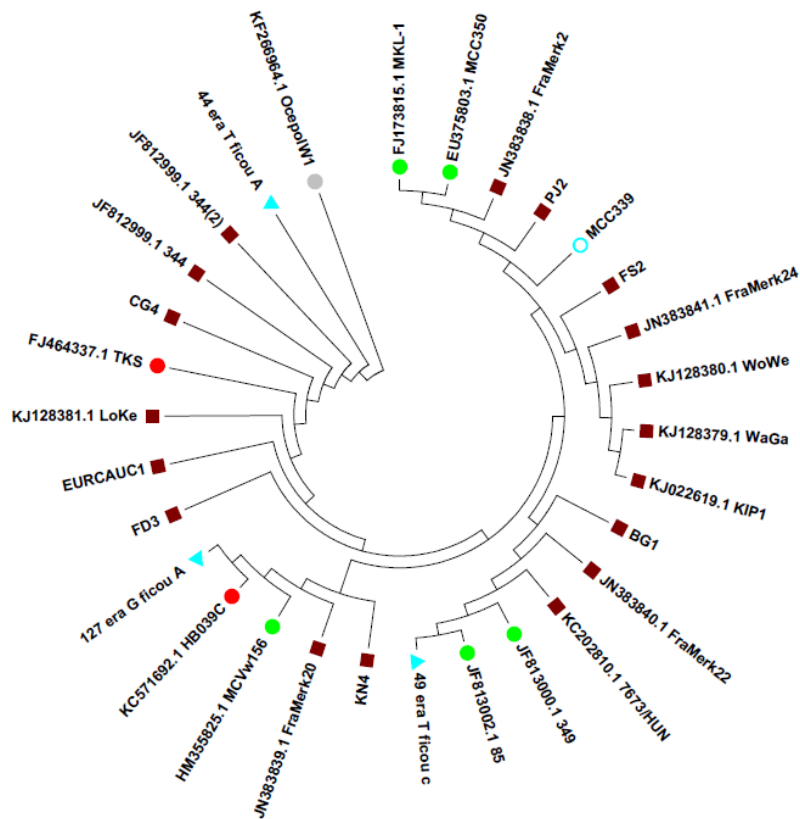


Figura 9: Árvore filogenética das variantes LT3. Aparecem a distribuição geográfica e o número de acesso do isolado. Árvore de agrupamento de vizinhos pelo método de bootstrap com 1000 repetições usando modelo Tamura 3 parâmetros. Origem geográfica das variantes: ■ Europa, ● EUA; ● Oceania, ● Ásia. As variantes encontradas em nosso estudo são demonstradas na figura por ▲. ● descreve o protótipo.

4.6.2. Análise filogenética do fragmento VP1.

Para o banco de dados do fragmento VP1 com maior número de variantes depositadas no NCBI, o modelo de análise obtido pelo software MEGA 7.0, com o melhor poder de resolução pelo valor de BIC, foi o Tamura 3 parâmetros. Conforme descrito acima, Tamura aprimorou o modelo descrito por Kimura em 1980 por levar em conta a possível interferência nos resultados causado por um conteúdo CG desproporcional. Podemos notar, pela figura 10, uma árvore com ramos com maior agrupamento das amostras de mesma origem geográfica. O fato de termos maior número de sequências de origem asiática pode ter sido fundamental para esse resultado. Em concordância com o obtido na árvore do fragmento LT3 notamos que as variantes encontradas na casuística ocorrem distribuídas por todos os ramos da árvore.

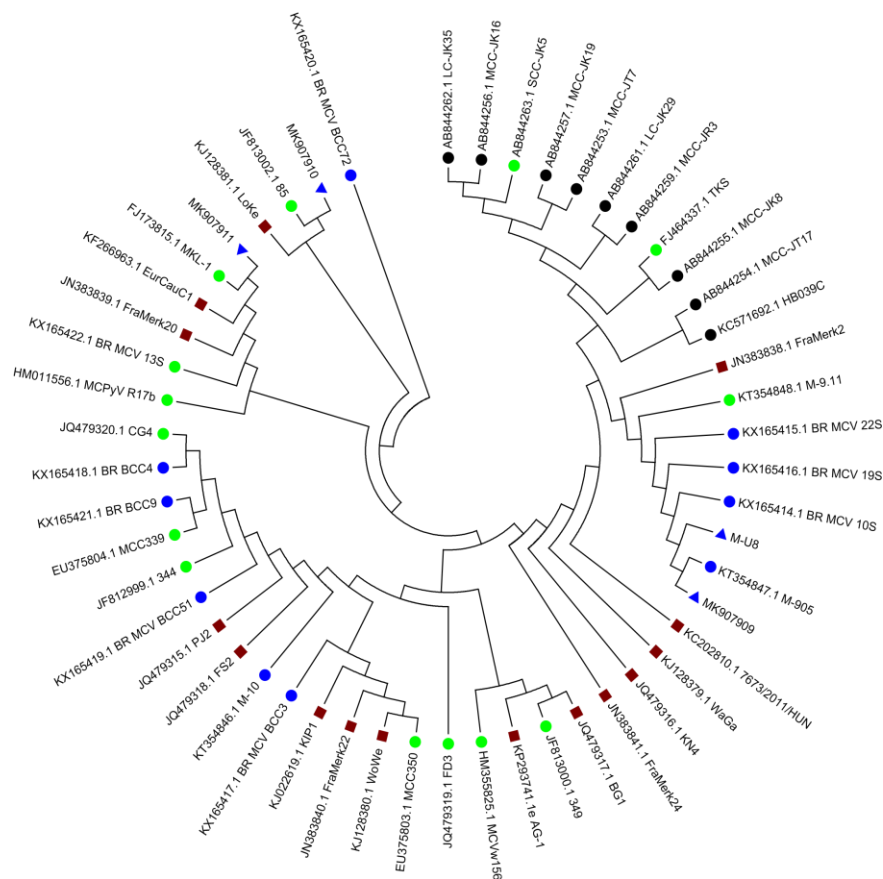


Figura 10: Árvore filogenética das variantes VP1. Aparecem a distribuição geográfica e o número de acesso do isolado. Árvore de agrupamento de vizinhos pelo método de bootstrap com 1000 repetições usando modelo Tamura 3 parâmetros. Origem geográfica das variantes do banco de dados: ■ Europa; ● EUA; ● América do Sul e ● Ásia . Variantes de nossa casuística ▲ .

4.6.3. Árvore filogenética dos fragmentos LT3 e VP1.

Buscando aumentar a capacidade de visualizar diferenças filogenéticas entre os isolados, outra abordagem adotada foi a de construir árvores filogenéticas com um fragmento formado da união sequencial dos fragmentos LT3 e VP1, ambos encontrados na mesma amostra. Esse fragmento ficou definido como fragmento concatenado. Podemos notar pela figura 11, que apesar de termos ramos bem diferenciados as variantes encontradas em nossa casuística não apresentam um agrupamento capaz de refletir sua origem geográfica. As variantes ficam distribuídas pela árvore sem apresentar um ramo definido. A característica miscigenada da população Brasileira (135) pode ser responsável por esse padrão de distribuição onde são as variantes que definimos aparecem dispersas por toda a árvore.

Para efetuar a análise do fragmento concatenado as sequências foram unidas conforme sua ocorrência na mesma amostra. A tabela 13 descreve as sequências utilizadas na geração deste fragmento. Observamos que a variabilidade é sempre pequena. Quando havia presença de variações na sequência em um fragmento o outro fragmento era semelhante ao protótipo. Para este fragmento concatenado o modelo de análise com o melhor poder de resolução, segundo o valor de BIC obtido pelo software MEGA 7.0, foi o Tamura 3 parâmetros. Podemos notar, pela figura 11, que em comparação com a árvore do fragmento LT3, temos maior número de ramos. O agrupamento das amostras do banco de dados do fragmento concatenado indica que o fragmento VP1 parece ser o fragmento capaz de gerar maior definição das árvores.

Tabela 13: Sequências concatenadas. A sequencia concatenada gerada e a respectiva variante de cada fragmento LT3 e VP1 combinada.

SEQUÊNCIA	LT3	VP1
1	protótipo	protótipo
2	protótipo	M-U8
3	protótipo	MK907911
4	protótipo	MK907910
5	44 A/T	protótipo
6	127 A/G	protótipo
7	49 C/T	protótipo
8	Protótipo	MK907909

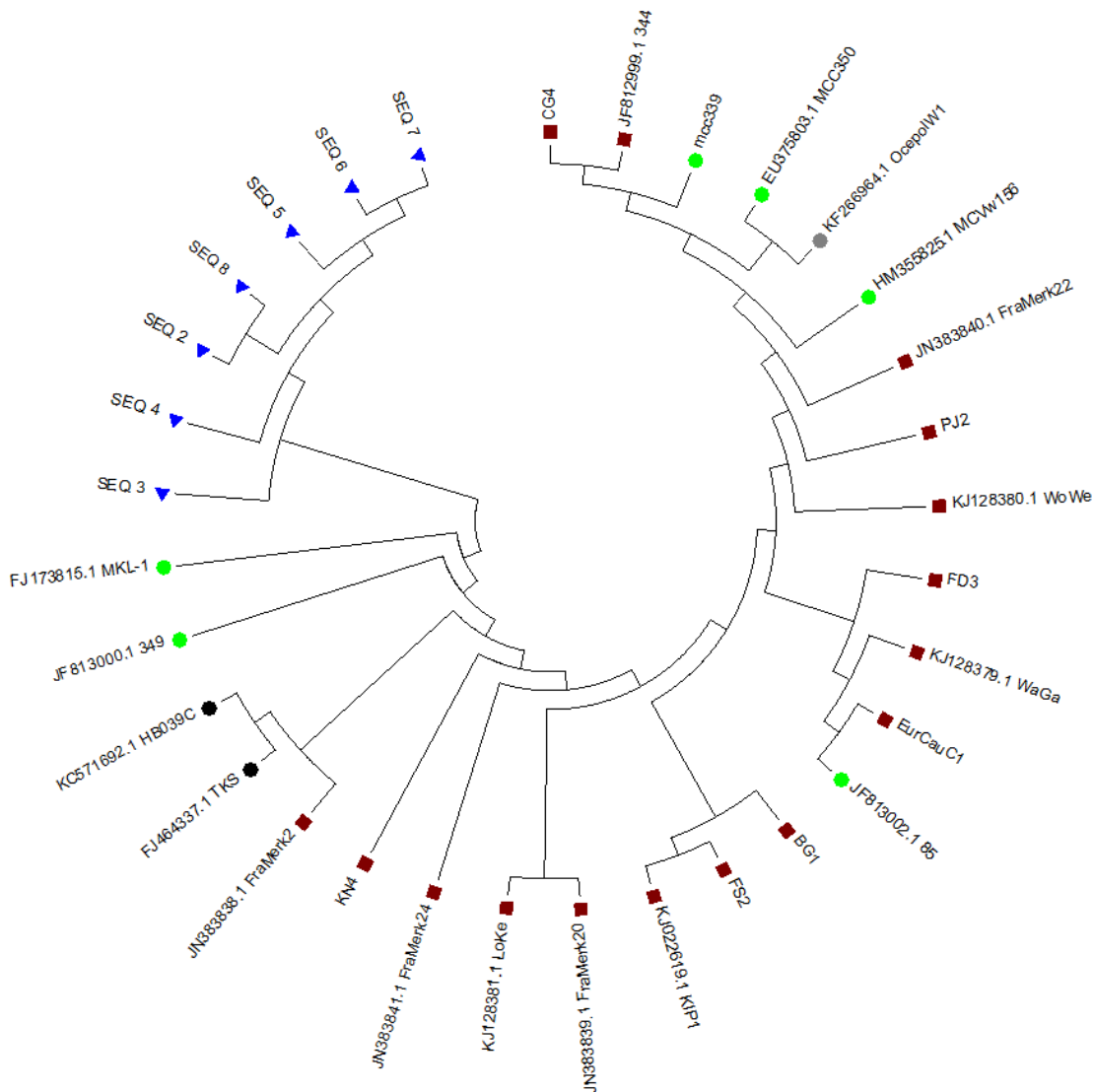


Figura 11: Árvore filogenética das variantes concatenadas. Aparecem a distribuição geográfica e o número de acesso do isolado. Árvore de agrupamento de vizinhos pelo método de bootstrap com 1000 repetições usando modelo Tamura 3 parâmetros. Origem geográfica das variantes do banco de dados: ■ Europa; ● EUA; ● Oceania e ● Ásia . Variantes de nossa casuística ▲ .

4.7. Detecção de HPV.

Visando determinar a prevalência de HPV do gênero beta em nossas amostras realizamos uma análise piloto em um grupo de dez amostras. Para isto foi utilizada a técnica de Luminex. Os resultados obtidos mostraram a ausência de HPV deste gênero nas amostras analisadas. Assim, decidimos analisar a presença de Alfapapilomavírus, também através da técnica de Luminex. Para isso foi selecionado um novo grupo de dez amostras, não relacionado ao que havia sido submetido à detecção de Betapapilomavírus. Neste caso, detectamos uma alta prevalência (80 %) de HPV nas amostras. Interessantemente, detectamos uma alta taxa de infecção por múltiplos tipos de

Alfapapilomavírus (50%). De fato, detectamos a presença de cinco tipos virais em dois casos não relacionados. Para descartarmos a influência da presença do DNA de MCPyV no teste para detecção de HPV selecionamos um terceiro subgrupo que foi testado através da técnica “INNO-LIPA” Neste terceiro subgrupo decidimos testar três amostras positivas e três amostras negativas para MCPyV, onde para as positivas tínhamos resultado de Alfapapilomavírus por Luminex. Visando diminuir a possibilidade de resultados falsos positivos gerados por contaminação com material amplificado foram utilizadas novas diluições de DNA das amostras correspondentes. Assim, as amostras analisadas por “INNO-LIPA” foram três casos positivos para MCPyV, já analisados para a presença de DNA de Alfapapilomavírus em duas diluições, e três casos negativos para MCPyV. O resultado obtido foi de alta prevalência também com múltiplas infecções mas sem correlação entre as diluições e também entre os testes. Considerando: a) a ausência de tipos de Betapapilomavírus em amostras de pele; b) a alta taxa de positividade para tipos de Alfapapilomavírus; c) a alta taxa de infecções por múltiplos tipos de Alfapapilomavírus; e d) a discrepância para os tipos detectados pelas diferentes técnicas utilizadas, decidimos realizar novas análises com outros iniciadores. Utilizando a metodologia de detecção proposta no trabalho (135), analisamos as 84 amostras de nossa casuística e usamos a positividade obtida para definir a prevalência de HPV. A existência de concordância de resultados nas diferentes amostras de um mesmo paciente foi o critério usado para definir prevalência de HPV, repetindo o que havíamos usado para definir prevalência de MCPyV.

Das 84 amostras analisadas apenas sete foram positivas, sendo cinco delas oriundas de tecidos primários e destes cinco, um apresentou também um CEC positivo. Esse caso repetiu o padrão de positividade nas amostras fornecidas pelo paciente tanto para MCPyV quanto para HPV. Resumidamente tanto primário como uma das amostras de tecido de CEC (localização - antebraço) apresentavam DNA de MCPyV e HPV detectável. Duas outras amostras CEC do mesmo paciente (localização – ambas em cabeça e pescoço sendo, uma região malar e outra da região parietal) não demonstraram apresentar DNA detectável pela técnica utilizada tanto para MCPyV quanto para HPV. A sétima amostra positiva para DNA de HPV era uma amostra de tecido de metástase. No entanto, outra metástase do mesmo paciente não apresentou DNA de HPV detectável. Assim, pelo nosso critério esse caso foi contabilizado como positivo para definição de prevalência para HPV, tabela 14.

Portanto em nossa casuística, com essa metodologia, definimos que em apenas 6 casos (10,5%) dentro do grupo de 57, era possível detectar a presença de DNA de HPV e assim definir sua prevalência.

Tabela 14: Positividade de HPV nas amostras. Casos, tipo de tecido em análise, resultados de PCR e definição quanto a positividade para HPV em pacientes de CCM.

<i>caso</i>	<i>tecido</i>	<i>PCR</i>	<i>resultado</i>
1549780	primário CCM	positivo	positivo
9067110	primário CCM	positivo	positivo
10275660	primário CCM	positivo	positivo
50025791	primário CCM	positivo	positivo
10845030	primário CCM	positivo	positivo
	CEC	positivo	
	CEC	negativo	
	CEC	negativo	
7001762	metástase	positivo	Positivo
	metástase	negativo	

4.8. Reação de Imuno-histoquímica.

Conforme descrito anteriormente, algumas proteínas virais de HPyV e HPV podem interferir com proteínas celulares. Essa alteração pode ser tanto em relação a detecção ou pode ser em relação ao perfil de localização citoplasmática. A progressão tumoral pode levar a formação de metástases que ocorrem em células que podem ser diferenciadas por alterações no padrão de algumas proteínas celulares. Essas alterações podem ser em proteínas com funções diversas, por exemplo, em proteínas relacionadas a mobilidade e estrutura celular ou também em proteínas relacionadas a alteração no padrão de outras proteínas, como fatores de transcrição. Por esse motivo buscamos definir o estado de proteínas conhecidas estariam envolvidas com arquitetura celular ou polaridade celular. Aqui, novamente gostaria de mencionar, ao fato do CCM ser definido como uma neoplasia onde o tumor muitas vezes apresenta tamanho reduzido. Desta maneira, o patologista responsável por efetuar a leitura dos resultados das reações de imuno-histoquímica também deveria estar atento a avaliação da presença tumoral. E desta forma, algumas lâminas foram excluídas da análise por ter sido verificada a ausência de tecido tumoral. Desta forma o número total de lâminas analisados, pelos diferentes marcadores, sofreu pequena variação e aparecem descritos na tabela 15.

Por se tratar de um tecido de origem epitelial, um dos marcadores escolhidos, e-caderina, apresenta grande importância. Dados referenciam alteração no padrão de expressão (136,137) alteração de localização (138) e mesmo sobre influência de outros vírus (139,140). Conforme demonstrado na tabela 15, a expressão de e-caderina em tecidos de CCM aparece diminuída.

Tanto em tecidos de tumores primários (sendo 32 negativos em um total de 43 tecidos) quanto nos tecidos de metástases (sendo 16 negativos em um total de 21 tecidos) a taxa de negativos foi de 76,1 %. Nas recidivas esse valor também foi próximo, onde 75 % deles foram negativos.

Na aquisição de um fenótipo mais invasivo, marcadores relacionados à capacidade de migração e mobilidade celular, como a detecção da expressão da proteína vimentina, são esperados. A proteína vimentina tem um padrão claramente mesenquimal. Para vimentina, a expressão também foi em baixas taxas de positividade. No grupo de tecidos primários teve 86 % negativos (sendo 32 negativos em um total de 43 tecidos) enquanto nos tecidos de metástases ficou em 95 % como negativos. Para os tecidos de recidivas analisados por esse marcador 67 % foram positivos.

Outra proteína analisada foi o fator de transcrição Snail. Snail é na verdade um conjunto de proteínas, ou uma família de proteínas, que atuam na transcrição. Nosso anticorpo reconhece duas formas desta família. Snail tem como alvo a sequência com padrão CACCTG proximal. A regulação depende da proximidade do sítio em relação ao promotor. Sua atividade é mediada pela atuação em alvos que apresentem em sua região promotora o padrão, em sua maioria das vezes, reprimindo sua expressão (141). Essa proteína ocorre alterada em tumores com características de transição epitélio mesênquima e sua influência sobre e-caderina serve de padrão de sua interferência.

Para o marcador Snail, em todos os tecidos analisados houve marcação positiva, descrita majoritariamente como sendo uma marcação forte pelo patologista.

Tabela 15: Positividade por marcadores por tecido. Aparecem tabulados os resultados das marcações por IHQ, separando entre positivos e negativos. Dados dos diferentes tecidos analisados aparecem separados em colunas e o total por positividade para o marcador analisado.

marcador	pos/neg	primário N (%)	recidiva N (%)	metástase N (%)	total N (%)
vimentina	pos	6 (14)	2 (67)	1 (5)	9 (13,6)
	neg	37 (86)	1 (33)	19 (95)	57 (86,3)
	total	43 (100)	3(100)	18(100)	
e-caderina	pos	10 (23,8)	1 (33)	5 (23,8)	16 (24,2)
	neg	32 (76,2)	2 (67)	16 (76,2)	50 (75,7)
	total	42(100)	3 (100)	21 (100)	
snail	pos	32 (100)	3 (100)	16 (100)	51 (100)
	neg	0	0	0	0
	total	32 (100)	3 (100)	16 (100)	

Na figura, imagens representativas de amostras com padrão de resultados pelos marcadores, em série. Buscamos separar apenas em casos vimentina positivos ou não.

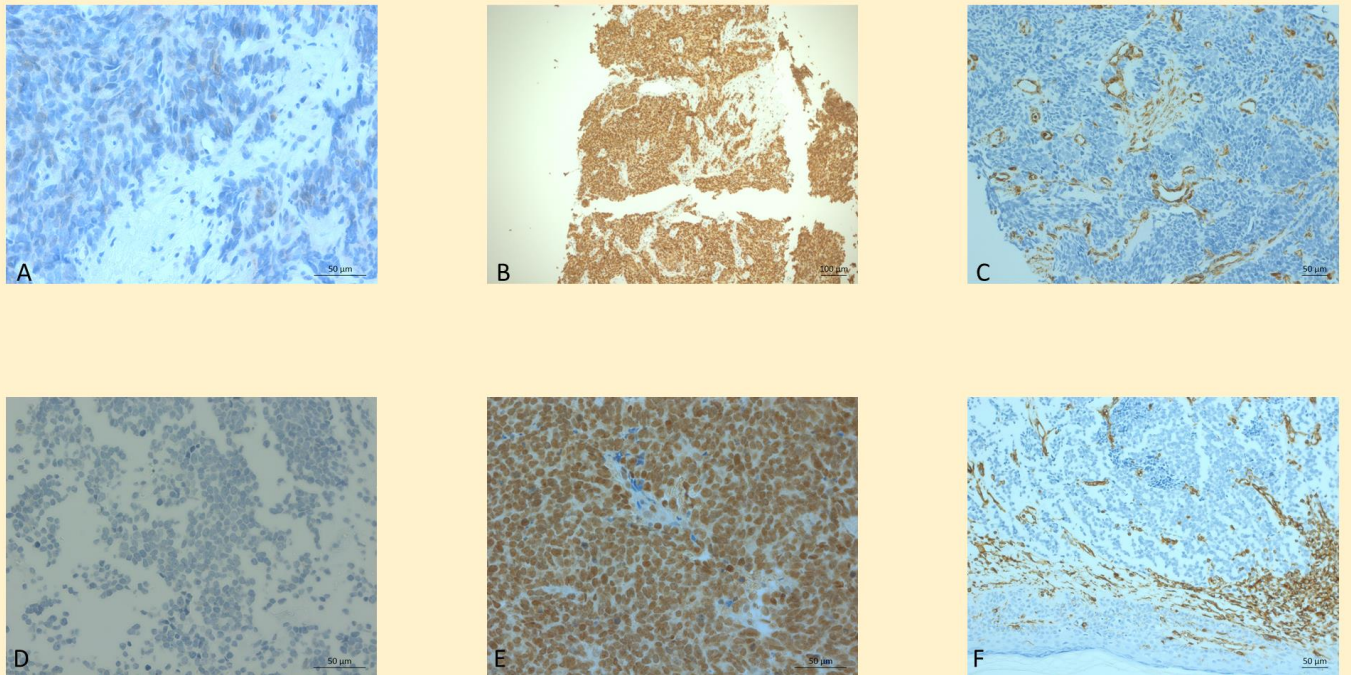


Figura 12: Exemplos de resultados de IHQ. Nas imagens demonstramos padrão de resultado obtido. Lâminas de metástase foram marcadas com: A) e-caderina; B) Snail e C) vimentina; enquanto lâminas de tecido primário foram marcadas com: D) e-caderina; E) Snail e F) vimentina. Podem-se ser visualizados núcleos individualizados como em (A), padrão de marcação (em marcação marron) tipicamente mesenquimal nos vasos em (C) A barra de escala, com a referência em micras, aparece na porção direita inferior da imagem.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo analisamos a prevalência do MCPyV em 57 casos de CCM. Esta é uma das maiores casuística de CCM no mundo e pode fornecer dados relevantes sobre a prevalência desse agente em tumores da população brasileira. Com este estudo buscamos o conhecimento da condição patológica CCM, principalmente por mensurar as participações virais. Mas a meta principal é buscar um melhor tratamento para oferecer aos pacientes. O grupo de pacientes na casuística foi composto por uma porcentagem semelhante de homens e mulheres, sendo de 49,2 % de homens e de 50,8 % de mulheres. Dados de estudos conduzidos em outros laboratórios mostram que esse tumor é mais frequente em homens (61% dos casos) (5, 6, 142). O nosso dado, além da alta prevalência viral detectada (95%), demonstra uma distribuição uniforme entre os sexos o que pode representar uma característica específica da população Brasileira. Nesse sentido, é possível que, a exposição a cofatores como a exposição a radiação UV nessa região geográfica acarrete consequências semelhante aos indivíduos de ambos os sexos. No entanto, até o momento, não podemos explicar essa diferença. A realização de estudos com amostras de diferentes centros e com dados sociodemográficos mais completos é necessária para verificar essa observação. Quanto a idade apresentada pelos pacientes, no momento do diagnóstico, não observamos diferenças entre os sexos. Na mediana de idades os valores são bem próximos, 71-73 anos para homens e mulheres, respectivamente. No entanto, existe o caso de um paciente do sexo masculino diagnosticado com CCM aos 23 anos. O paciente não apresentava outra lesão neoplásica, recebeu tratamento adjuvante e, em janeiro de 2017, estava vivo e sem indicação de doença. Estudos da incidência de CCM na população indicam que 5% dos casos são diagnosticados em indivíduos menores de 50 anos (4). Em 2011, Bzhalava e colaboradores descreveu em sua casuística, categorizada por faixa de idade, o caso de um paciente diagnosticado com CCM antes dos 29 anos de idade (111).

Em nossa casuística, 10,5% dos casos apresentavam metástases e essas com localização próximas ao tumor primário. Em nossa análise para o marcador vimentina 95% das metástases eram negativas. Esses dados nos permitem especular que amostras de metástases de CCM com resultado da taxa de expressão maior poderiam ocasionar número um maior de metástases a distância, conforme observado para amostras de carcinoma de esôfago (143). Quanto aos locais de detecção do tumor primário, nossos dados refletem os descritos para o CCM (4). Região da cabeça

e pescoço e a região dos membros superiores, como sítios de maior taxa de detecção da lesão (36,1 - 29,8%) enquanto regiões mais protegidas, como a região dos glúteos com pequena participação (6%), mas presentes. Em relação à análise da localização anatômica das amostras de outras entidades histológicas presentes dos pacientes de CCM de nosso estudo, as taxas por região anatômica refletem o achado para os tumores primários, onde a região de cabeça e pescoço é a mais frequentemente acometida (41,7%). Membros inferiores, diferentemente do que havíamos encontrado nos tumores primários, aparece com a segunda região mais afetada (25%). Se analisarmos apenas outras neoplasias, neste grupo de entidades histológicas nossa taxa de segundas neoplasias aparece bem mais alto (17,5%) que o observado em outros estudos 5 % (100-101).

No nosso trabalho tomamos decisões que determinaram desde o início uma postura rígida de trabalho, e que serviram, para trazer mudanças durante o processo de obtenção dos resultados. Essas decisões foram de manter a rigidez de trabalho para evitar contaminação da amostra no isolamento e durante a obtenção dos resultados, mas também na busca pelos melhores dados. Acreditamos que um dado é diferente de um resultado experimental. Desta forma, algumas alternativas de testes foram tentadas na busca pelo melhor resultado. Na questão de controle de contaminação, temos que, a contaminação cruzada é um dos grandes temores de qualquer laboratório. Foram seguidos procedimentos visando minimizar todas as fontes de contaminação cruzadas que vislumbramos poderiam ter sua origem no laboratório. Mas sabemos que mesmo em momentos anteriores ao laboratório de análise do material biológico, na mesa cirúrgica ou durante o processamento da peça, no laboratório do serviço de patologia. Em nosso laboratório, foi implementado procedimentos rotineiros e definidos para isolamento de DNA e, quanto as reações de PCR, usamos a estratégia de inclusão de controles sempre que possível, buscando minimizar esse problema de contaminação. Desta forma, a extração e isolamento do DNA, o preparo da solução de reação de PCR, também chamado de “PRÉ-MIX”, a adição do DNA ao “PRÉ-MIX” e a análise do produto desta reação, sempre eram executados em salas independentes e destinadas a estes fins. Acreditamos e decidimos que toda a extração de DNA deveria seguir um protocolo rígido de procedimentos na intenção de minimizar ao máximo a possibilidade de contaminação cruzada. Os isolamentos de DNA eram processados em etapas com reduzido número de amostras, por isolamento. Nesta etapa de isolamento, quando ocorria manipulação da amostra, cada amostra era processada por vez. Entre cada amostra ocorriam troca de luvas, troca de lâminas de bisturi e demais materiais que tivessem contado com o material biológico. As estantes e a bancada eram limpas com NaOH 1 %, sempre que iniciáramos o trabalho com nova amostra. Ao término dos

trabalhos, a limpeza era repetida. Para servir de controle da etapa de isolamento de DNA, amostras de cultivo de células de linhagens irrelevantes tiveram o DNA isolado nas mesmas condições. Esses DNAs, uma vez que eram isolados e ajustados para as mesmas concentração das amostras, eram usados como controles nas reações de PCR.

Assim como encontrado na literatura, o tamanho do amplicon obtido na PCR de material isolado de blocos de parafina fixados com formalina mostrou influenciar a positividade resultante. A fonte de informações contidas nessa forma de armazenamento de amostras biológicas é imensa mas esta característica é uma característica consistente. O tamponamento da solução de formalina usada na etapa de fixação do tecido trouxe um ganho na qualidade do material genético isolado a partir deste tipo de material (144), mas mesmo assim existe uma influência do tamanho do amplicon.

Outro aspecto da detecção do MCPyV bem interessante foi a diferença de detecção definida pelos diferentes iniciadores direcionados à amplificação de diferentes fragmentos dos genes virais. Em nossa padronização de detecção a variação, definida para um subconjunto de amostras dentro da casuística variou de 20 a 70 %. Essa variação foi verificada em trabalhos descritos na literatura que também buscaram avaliar esses marcadores de maneira concordante. Sempre a região do genoma viral que codifica a porção mais N terminal da proteína, pelo par de iniciadores LT3, sempre resultam em maior positividade (42,71,102,128). Esse dado pode ser explicado pela atuação no gene celular pRb necessária a manutenção do fenótipo maligno, em análises realizadas *in vitro*.

Em nossa análise obtivemos uma mudança quando passamos a analisar as amostras utilizando iniciadores para um amplicon menor. A escolha foi realizada para reproduzir a condição informativa que era validada no controle. Assim, como o controle de amplificação utilizado apresentava um amplicon de 110 pares de bases, desenhamos e sintetizamos iniciadores complementares a região localizada na região N-terminal do antígeno T do genoma do MCPyV, um pouco menor, de um tamanho de 103 pares. Apesar de os 309 pb que o descrito por Feng e colaboradores em 2008 (19), não ser tão maior acreditamos que seja a única explicação para esse grande aumento de positividade. A prevalência de MCPyV determinada para a casuística analisada foi de 94,8 %. Esse era um dos principais objetivos desse estudo e procuramos eliminar pontos que achávamos poderiam ter maior interferência nesse resultado

Essa alta positividade, maior que 90 % (4,71,145,146) chegando até 100 % (128,147) foi descrita em outros trabalhos. Nos trabalhos descritos além de detectarem a molécula de DNA por

PCR ou qPCR, detectaram a presença do antígeno viral por IHQ em alta taxa de prevalência 71, 128, 145,) ou detectaram através de hibridação com sonda marcada com fluorescência ou também por IHQ (Moshiri, 2017). Aqui podemos extrapolar o nosso resultado de análise de variantes obtidos com essa alta positividade por IHQ usando um anticorpo monoclonal. Essa alta taxa de detecção demonstra o alto grau de conservação deste fragmento da proteína VP1. Um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer 90 % dos casos (N=282 casos) deve reconhecer uma região bem conservada da proteína entre as variantes moleculares (148). Tanto para o fragmento LT3 quanto para o fragmento VP1, nenhuma das alterações nucleotídicas descritas em nosso estudo acarretaram alteração na cadeia de aminoácidos das respectivas proteínas. Este resultado de alta conservação corrobora o achado de Kassem e cols. (2008) onde pouca variabilidade genética foi verificada quando descreveram este fragmento em amostras de CCM provenientes de 39 pacientes alemães.

As análises filogenéticas propostas demonstraram pela distribuição apresentadas pelas amostras do estudo que as amostras brasileiras são constituídas por componentes de representatividade global. Não houve uma ramificação característica das análises com os fragmentos separados. Na análise do fragmento concatenado passamos a apresentar um ramo único formado pelas amostras do estudo. Essa alternativa foi a que melhor separou as amostras do estudo.

Conforme observado a metodologia de sequenciamento direto não foi suficiente para determinar a sequência nucleotídica em algumas amostras. Interessantemente, as amostras que não geraram resultado para LT3 e VP1 não eram as mesmas. Essas amostras foram analisadas com as demais e apresentavam bandas de boa intensidade. No entanto, não foi possível obter sequências de boa qualidade. Como em nenhum momento não foi identificada nenhuma outra sequência não relacionada à sequência esperada e os casos forem positivos pela PCR usada para definir positividade, definimos esses casos como sendo positivos não indentificados para esse fragmento. Em alguns casos o resultado obtido parecia indicar uma possível a existência de co-infecção. O evento de co-infecção é um evento que foi comprovado em nossas amostras. Análise de sequenciamento de plasmídeos deste fragmento VP1 identificou a presença de diferentes variantes (duas) em uma mesma amostra. Para os marcadores de migração celular e invasão estudados nossos resultados reforçam os achados em outros estudos de CCM. Apesar da variabilidade na perda de marcação ser grande (57-95%) (136, 137, 138) podemos dizer que nossos resultados de marcação por e-caderina na casuística, reforça essa evidência de perda de expressão desta molécula. A perda da expressão desta molécula ou sua ocorrência em outro sítio celular, como visto em marcações positivas desta proteína no núcleo (138) resultaria em menor afinidade de

ligação célula-célula que como consequência final acarretaria num fenótipo mais invasor. Dado de análise da presença do vírus Varicella-zóster da influência da expressão de e-caderina em cultura in vitro (140), de miofibroblasto humano, demonstrou ocorrer uma troca nos níveis de expressão com diminuição da expressão de e-caderina para um aumento da expressão de n-caderina. Nesse estudo descreveram a participação de IL-6 nessa troca de expressão, que levaria à um ganho de capacidade invasiva desta célula. As proteínas E6 e E7 de HPV quando expressas por meio de transfecção atuam promovendo a diminuição de e-caderina, entre outras proteínas relacionadas a polaridade celular, de maneira a promover o fenótipo mesenquimal (128). Análise de transcriptoma definiu sendo o gene PIR, cuja proteína resultante é a pirina, como um alvo das proteínas E6 e E7 de HPV 16. Neste trabalho verificou-se que a expressão heteróloga destas proteínas levaria à aumento dos níveis de pirina e, como consequência desta alteração, uma diminuição dos níveis de e-caderina e a promoção da expressão de vimentina. Ainda no mesmo trabalho demonstraram que, por interferir especificamente neste sistema de expressão, os níveis basais eram retomados (130). Em outro trabalho, (139) demonstrou uma diminuição da expressão de e-caderina em cultura de células transformadas com plasmídeo que expressava o antígeno LANA do vírus do sarcoma de Kaposi. Independente da forma de alteração de e-caderina, tanto por perda da expressão, acúmulo em sítio não funcional ou troca do padrão de isoformas, acarretaria o mesmo fenótipo de maior invasividade.

No padrão de expressão de vimentina nossos resultados confirmam os achados na literatura. Em nossa casuística apenas 14 % das amostras apresentaram marcação para esse marcador. A questão entre a baixa taxa de marcação para vimentina e ausência de metástases a distância, cabe aqui novamente. Bobos e cols. em uma pequena casuística (14 casos) de CCM da Grécia registrou a marcação para vimentina em 7 % dos seus casos. Em contra partida, ao MCPyV, a infecção causada pelo vírus do sarcoma de Kaposi, um Herpes vírus humano (HHV8) altera a expressão de algumas proteínas relacionadas a invasão, inclusive promovendo aumento da expressão de vimentina (139). Amostras de carcinomas cervical, onde quase a totalidade (94%) foi definida como HPV16 positiva apresentou da taxa de positividade de 72 % para vimentina (149). Em cultura de células epiteliais expressando as proteínas E6 e E7 de HPV 16 foi demonstrado dois pontos relacionados perda de polaridade. Neste estudo demonstraram um o aumento da expressão de Snail e também a alteração fenotípica da linhagem celular para uma morfologia mais mesenquimal (131). O fato dos tecidos de recidivas apresentarem 75 % de marcação positiva para a vimentina, poderia ter no pequeno número deste grupo de amostras, sua explicação.

No padrão de expressão de Snail a ativação deste fator de transcrição foi unânime. Em todas as amostras analisadas obtivemos marcação positiva como obtido na casuística da Finlândia (150). Neste estudo 133 amostras de tumor foram obtidas de 133 pacientes e em todas amostra houve marcação positiva para esse marcador. Como repressor de e-caderina, o resultado positivo de marcação para a proteína Snail tem concordância com a diminuição descrita para e-caderina. E essa alteração aparece em todos os tipos de tecidos analisados.

6 CONCLUSÕES

- Em nossa casuística prevalência de DNA de MCPyV, determinada pela amplificação do fragmento de 103 pb na porção mais 5' do gene do antígeno T, foi de 94%;
- O fragmento LT3 de 309 pb do Antígeno T é muito conservado, sendo a sequência protótipo a mais frequente;
- O fragmento de 351 pb do gene VP1 apresenta maior número de substituições nucleotídicas;
- A estratégia de analisar o fragmento concatenado descreveu o obtido por VP1, apesar de agrupar as sequências de maneira separada;
- Em nossa casuística, a prevalência de DNA de HPV determinada pela amplificação do fragmento de 150 pb do gene L1 foi de 10,5 %;
- Os resultados da IHQ definiram que para os marcadores celulares e-caderina e vimentina a taxa de detecção foi de < 25 % das amostras;
- Marcador celular Snail foi detectado em 100 % das amostras da casuística.

APÊNDICES

Apêndice 1



REVIEW ARTICLE

Human polyomaviruses and cancer: an overview

José Carlos Mann Prado, Telma Alves Monezi, Aline Teixeira Amorim, Vanesca Lino, Andressa Paladino, Enrique Boccardo*

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, BR.

Prado JC, Monezi TA, Amorim AT, Lino V, Paladino A, Boccardo E. Human polyomaviruses and cancer: an overview. *Clinics*. 2018;73(suppl 1):e558s

*Corresponding author. E-mail: eboccardo@usp.br

The name of the family *Polyomaviridae*, derives from the early observation that cells infected with murine polyomavirus induced multiple (*poly*) tumors (*omas*) in immunocompromised mice. Subsequent studies showed that many members of this family exhibit the capacity of mediating cell transformation and tumorigenesis in different experimental models. The transformation process mediated by these viruses is driven by viral pleiotropic regulatory proteins called T (tumor) antigens. Similar to other viral oncoproteins T antigens target cellular regulatory factors to favor cell proliferation, immune evasion and downregulation of apoptosis. The first two human polyomaviruses were isolated over 45 years ago. However, recent advances in the DNA sequencing technologies led to the rapid identification of additional twelve new polyomaviruses in different human samples. Many of these viruses establish chronic infections and have been associated with conditions in immunosuppressed individuals, particularly in organ transplant recipients. This has been associated to viral reactivation due to the immunosuppressant therapy applied to these patients. Four polyomaviruses namely, Merkel cell polyomavirus (MCPyV), Trichodysplasia spinulosa polyomavirus (TSPyV), John Cunningham Polyomavirus (JCPyV) and BK polyomavirus (BKPyV) have been associated with the development of specific malignant tumors. However, present evidence only supports the role of MCPyV as a carcinogen to humans. In the present review we present a summarized discussion on the current knowledge concerning the role of MCPyV, TSPyV, JCPyV and BKPyV in human cancers.

KEYWORDS: MCPyV; BKPyV; JCPyV; TSPyV; Human cancer.


APÊNDICES

Apêndice 2- publicação 2



Article / Autopsy Case Report

Progressive multifocal leukoencephalopathy: a challenging diagnosis established at autopsy

Cesar Castello Branco Lopes^a , Murillo Crivillari^b, José Carlos Mann Prado^c,
Cristiane Rubia Ferreira^d, Pedro José dos Santos Neto^e, Vilma Takayasu^f,
Lorena Silva Laborda^f

How to cite: Lopes CCB, Crivillari M, Prado JCM, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy: a challenging diagnosis established at autopsy. *Autops Case Rep* [Internet]. 2019;9(1):e2018063. <https://doi.org/10.4322/acr.2018.063>

APÊNDICES

Apêndice 3- aguardando publicação.

Letter to the Editor

Detection of human papillomaviruses and human polyomaviruses in immunosuppressed and immunocompetent individuals with actinic cheilitis: a case series

D.R. Neto Pimentel, E. Montosa Nunes, L. Termini, R. Almeida Lima Nunes, R.V. Mendoza Lopez, S. Ferreira, E. Boccardo, J.C. Mann Prado, M.M.S.S. Enokihara, L. Sichero ✉, J. Tomimori

First published: 07 July 2019 | <https://doi.org/10.1111/jdv.15779>

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1-Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol.* 1972;105(1): 107-10, <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1972.01620040075020>
- 2-Busam KJ, Walsh N, Wood BA. Merkel cell Carcinoma. In Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. Who classification of skin tumours. 4 ed.Lyon: IARC;2018.p 48-50.
- 3-Reichgelt, BA; Visser, O. Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993-2007. *Eur J Cancer* 2011;v. 47(4): 579-85. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144740> >.
- 4-Agelli, M; Clegg, LX. Epidemiology of primary Merkel cell carcinoma in the United States. *J Am Acad Dermatol*, 2003; 49(5): 832-41. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576661> >.
- 5-Youlden DR, Youl PH, Peter Soyer H, Fritschi L, Baade PD. Multiple primary cancers associated with Merkel cell carcinoma in Queensland, Australia, 1982-2011. *J Invest Dermatol.* 2014;134(12):2883-9, <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.266>.
- 6-Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, et al. Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63(5):751-61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2010.02.056>.
- 7-Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Peñas PF, et al. Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol.* 2008;58(3):375-81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2007.11.020>
- 8-Duprat JP, Landman G, Salvajoli JV, Brechtbühl ER. A review of the epidemiology and treatment of Merkel cell carcinoma. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(10):1817-23.
- 9-Albores-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F, Sagy N, Schwartz AM, Henson DE. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. *J Cutan Pathol.* 2010;37:20–7.
- 10-Campillo R, Gil-Carcedo E, Alonso D, Vallejo LA, Oñate JM, Gil-Carcedo LM. Primary cutaneous neuroendocrine carcinoma, Merkel cell carcinoma. Case series 1991-2012. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2013;64(6):396-402, <http://dx.doi.org/10.1016/j.otorri.2013.06.003>.
- 11-Bobos M, Hytiroglou P, Kostopoulos I, Karkavelas G, Papadimitriou CS. Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. *Am J Dermatopathol.* 2006;28(2):99-104, <http://dx.doi.org/10.1097/01.dad.0000183701.67366.c7>.
- 12-Gao Z, Tseng CH, Pei Z, Blaser MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci.* 2007 104(8): 2927–32.
- 13-Tong, X, Leung, M, Wilkins, D, Cheung, H, Lee, P. Neutral Processes Drive Seasonal Assembly of the Skin Mycobiome. *mSystems.* 2009 4(2), Disponível em: <e00004-19. doi:10.1128/mSystems.00004-19>.
- 14-Schowalter RM, Pastrana D V, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe.* 2010;7(6): 509-15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006>
- 15-Weitzman I, Summerbell RC. The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews.*1995;8:240-259.
- 16-Foulongne V, Sauvage V, Hebert C, Dereure O, Cheval J, Gouilh MA, et al. Human skin microbiota: high diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS One.* 2012;7(6): e38499, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038499>.
- 17-Jablonska S, Dabrowski J, Jakubowicz K. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res.* 1972;32(3):583-9.
- 18-Gewirtzman A, Bartlett B, Tyring S. Epidermodysplasia verruciformis and human papilloma virus. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21:141–146. doi: 10.1097/QCO.0b013e3282f486c9.
- 19-Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science.* 2008;319(5866): 1096-100, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1152586>.

- 20-Ma Y, Madupu R, Karaoz U, Nossa CW, Yang L, Yooseph S, Yachinski PS, Brodie EL, Nelson KE, Pei Z. Human papillomavirus community in healthy persons, defined by metagenomics analysis of human microbiome project shotgun sequencing data sets. *J Virol.* 2014;88(9):4786-4797.
- 21-Viarisio D, Mueller-Decker DE, Kloz U, Aengeneyndt B, Kopp-Schneider A, Grone HJ, Gheit T, Flechtenmacher C, Gissma L, Tommasino M. E6 and E7 from betaHPV38 cooperate with ultraviolet light in the development of actinic keratosis-like lesions and squamous cell carcinoma in mice. *PLoS Pathog.* 2011;7(7):e1002125.
- 22-Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo M A, McGeoch D J, Pringle CR, Wickner RB. Virus taxonomy - Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1. Academic Press, 2000. 1162 pages ISBN 0123702003.
- 23-Johne R., Buck C. B., Allander T., Atwood W. J., Garcea R. L., Imperiale M. J., Major E. O., Ramqvist T., Norkin L. C. 2011. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 156: 1627–1634. doi: 10.1007/s00705-011-1008-x .
- 24-Calvignac-Spencer S., Feltkamp M. C. W., Daugherty M. D., Moens U., Ramqvist T., Johne R., Ehlers B., Polyomaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2016. A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Arch. Virol.* 161: 1739–1750. doi: 10.1007/s00705-016-2794-y.
- 25-Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971;1(7712):1257-60, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91777-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91777-6).
- 26-Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet.* 1971; 1(7712):1253-7, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91776-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4).
- 27- Prado JCM, Monezi TA, Amorim AT, Lino V, Paladino A, Boccardo E. Human polyomaviruses and cancer: an overview. *Clinics (Sao Paulo).* 2018 Sep 26;73(suppl 1):e558s. doi: 10.6061/clinics/2018/e558s. PubMed PMID: 30328951; PubMed Central PMCID: PMC6157077.
- 28-Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combelas N, et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5): 1767-70, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01691-09>.
- 29-Viscidi RP, Rollison DE, Sondak VK, Silver B, Messina JL, Giuliano AR, et al. Age-specific seroprevalence of Merkel cell polyomavirus, BK virus, and JC virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(10):1737-43, <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.05175-11>.
- 30-IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Malaria and some polyomaviruses (SV40, BK, JC, and Merkel Cell Viruses). *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2014;104:9-350.
- 31-Assetta B, Atwood WJ. The biology of JC polyomavirus. *Biol Chem.* 2017;398(8):839-55, <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2016-0345>.
- 32-Stewart SE, Eddy BE, Borgese N. Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J Natl Cancer Inst.* 1958;20(6):1223-43, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/20.6.1223>.
- 33-Butel JS, Lednicky JA. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(2):119-34, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/91.2.119>.
- 34-Howes SH, Bockus BJ, Schaffhausen BS. Genetic analysis of polyomavirus large T nuclear localization: nuclear localization is required for productive association with pRb family members. *J Virol.* 1996;70(6): 3581-8.
- 35-Tyagarajan SK, Frisque RJ. Stability and function of JC virus large T antigen and T' proteins are altered by mutation of their phosphorylated threonine 125 residues. *J Virol.* 2006;80(5):2083-91, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.80.5.2083-2091.2006>.
- 36-Sawai ET, Butel JS. Association of a cellular heat shock protein with simian virus 40 large T antigen in transformed cells. *J Virol.* 1989;63(9): 3961-73.
- 37-Hahn WC, Dessain SK, Brooks MW, King JE, Elenbaas B, Sabatini DM, et al. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol.* 2002;22(7):2111-23, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.22.7.2111-2123.2002>.
- 38-Ishizu KI, Watanabe H, Han SI, Kanesashi SN, Hoque M, Yajima H, et al. Roles of disulfide linkage and calcium ion-mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of simian virus 40 VP1 capsid protein. *J Virol.* 2001;75(1):61-72, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.75.1.61-72.2001>.

- 39-Burkert O, Krener S, Sinn L, Giese S, Simon C, Lilie H. Biophysical characterization of polyomavirus minor capsid proteins. *Biol Chem.* 2014;395(7-8):871-80.
- 40-Simon C, Klose T, Herbst S, Han BG, Sinz A, Glaeser RM, et al. Disulfide linkage and structure of highly stable yeast-derived virus-like particles of murine polyomavirus. *J Biol Chem.* 2014;289(15):10411-8, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.484162>.
- 41-Deng YN, Zeng JY, Su H, Qu QM. Recombinant VLP-Z of JC Polyomavirus: A Novel Vector for Targeting Gene Delivery. *Intervirology.* 2015;58(6):363-8, <http://dx.doi.org/10.1159/000443832>.
- 42-Okada, Y. . Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol.* v. 7, n. 4, p. 302-6, Aug 2001. ISSN 1355-0284. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517407> >.
- 43 DeCaprio JA, Garcea RL. A cornucopia of human polyomaviruses. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):264-76, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2992>.
- 44--Delbue S, Comar M, Ferrante P. Review on the relationship between human polyomaviruses-associated tumors and host immune system. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:542092, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/542092>.
- 45-Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JI, Asomani SK, Jørgensen GE, Vignarajan S, et al. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res.* 1999;59(5):1160-3.
- 46-Das D, Shah RB, Imperiale MJ. Detection and expression of human BK virus sequences in neoplastic prostate tissues. *Oncogene.* 2004;23(42): 7031-46, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207920>.
- 47-Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB, Brautigan DL, et al. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell.* 1990;60(1): 167-76, [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90726-U](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90726-U).
- 48-Schuchner S, Wintersberger E. Binding of polyomavirus small T antigen to protein phosphatase 2A is required for elimination of p27 and support of S-phase induction in concert with large T antigen. *J Virol.* 1999; 73:9266-9273.
- 49-Feng H, Kwun HJ, Liu X, Gjoerup O, Stolz DB, Chang Y, et al. Cellular and viral factors regulating Merkel cell polyomavirus replication. *PLoS One.* 2011;6(7):e22468, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022468>.
- 50-Shuda M, Kwun HJ, Feng H, Chang Y, Moore PS. Human Merkel cell polyomavirus small T antigen is an oncoprotein targeting the 4E-BP1 translation regulator. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3623-34, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI46323>.
- 51-Houben R, Shuda M, Weinkam R, Schrama D, Feng H, Chang Y, et al. Merkel cell polyomavirus-infected Merkel cell carcinoma cells require expression of viral T antigens. *J Virol.* 2010;84(14):7064-72, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02400-09>.
- 52-Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, et al. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(42):16272-7, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806526105>.
- 53-Foulongne V, Dereure O, Kluger N, Molès JP, Guillot B, Segondy M. Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases. *Br J Dermatol.* 2010;162(1):59-63, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09381.x>.
- 54-Martel-Jantin C, Filippone C, Cassar O, Peter M, Tomasic G, Vielh P, et al. Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Virology.* 2012;426(2):134-42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.018>.
- 55-Kenan DJ, Mieczkowski PA, Burger-Calderon R, Singh HK, Nিকেleit V. The oncogenic potential of BK-polyomavirus is linked to viral integration into the human genome. *J Pathol.* 2015;237(3):379-89, <http://dx.doi.org/10.1002/path.4584>.
- 56-Samimi M, Gardair C, Nicol JT, Arnold F, Touzé A, Coursaget P. Merkel cell polyomavirus in merkel cell carcinoma: clinical and therapeutic perspectives. *Semin Oncol.* 2015;42(2):347-58, <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.021>.
- 57- Kassem A, Schöpflin A, Diaz C, Weyers W, Stickeler E, Werner M, et al. Frequent detection of Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas and identification of a unique deletion in the VP1 gene. *Cancer Res.* 2008;68(13):5009-13, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0949>.

- 58-Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, et al. T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(42):16272-7, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806526105>.
- 59-Foulongne V, Dereure O, Kluger N, Molès JP, Guillot B, Segondy M. Merkel cell polyomavirus DNA detection in lesional and nonlesional skin from patients with Merkel cell carcinoma or other skin diseases. *Br J Dermatol*. 2010;162(1):59-63, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09381.x>.
- 60-Pallas DC, Shahrik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB, Brautigan DL, et al. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*. 1990;60(1): 167-76, [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90726-U](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90726-U).
- 61-Lee S, Paulson KG, Murchison EP, Afanasiev OK, Alkan C, Leonard JH, et al. Identification and validation of a novel mature microRNA encoded by the Merkel cell polyomavirus in human Merkel cell carcinomas. *J Clin Virol*. 2011;52(3):272-5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.08.012>.
- 62-Schwalter RM, Buck CB. The Merkel cell polyomavirus minor capsid protein. *PLoS Pathog*. 2013;9(8):e1003558, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003558>.
- 63-Li L, Li BB, Hock M, Wang E, Folk WR. Sequence flanking the pentanucleotide T-antigen binding sites in the polyomavirus core origin help determine selectivity of DNA replication. *J. Virol*. 1995;69(12):7570-7579.
- 64-Moens U, Calvignac-Spencer S, Lauber C, Ramqvist T, Feltkamp MC, Daugherty MD, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Polyomaviridae. *J Gen Virol*. 2017;98(6):1159-60, <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.000839>.
- 65-Schwalter RM, Pastrana D V, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe*. 2010;7(6): 509-15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006>.
- 66-Carter JJ, Paulson KG, Wipf GC, Miranda D, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Association of Merkel cell polyomavirus-specific antibodies with Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(21):1510-22, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djp332>.
- 67-Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009;5(3):e1000363, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000363>.
- 68-Tolstov YL, Pastrana DV, Feng H, Becker JC, Jenkins FJ, Moschos S, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *Int J Cancer*. 2009;125(6):1250-6, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24509>.
- 69-Touzé A, Gaitan J, Arnold F, Cazal R, Fleury MJ, Combélas N, et al. Generation of Merkel cell polyomavirus (MCV)-like particles and their application to detection of MCV antibodies. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5): 1767-70, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01691-09>.
- 70-Tolstov YL, Knauer A, Chen JG, Kensler TW, Kingsley LA, Moore PS, et al. Asymptomatic primary Merkel cell polyomavirus infection among adults. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(8):1371-80, <http://dx.doi.org/10.3201/eid1708.110079>.
- 71-Pastrana DV, Brennan DC, Cuburu N, Storch GA, Viscidi RP, Randhawa PS, et al. Neutralization serotyping of BK polyomavirus infection in kidney transplant recipients. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002650, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002650>.
- 72-Laude HC, Jonchère B, Maubec E, Carlotti A, Marinho E, Couturaud B, et al. Distinct merkel cell polyomavirus molecular features in tumour and non tumour specimens from patients with merkel cell carcinoma. *PLoS Pathog*. 2010;6(8):e1001076, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001076>.
- 73-Kantola K, Sadeghi M, Lahtinen A, Koskenvuo M, Aaltonen LM, Möttönen M, et al. Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: implications for respiratory transmission and latency. *J Clin Virol*. 2009;45(4):292-5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.04.008>.
- 74-Matsushita M, Kuwamoto S, Iwasaki T, Higaki-Mori H, Yashima S, Kato M, et al. Detection of Merkel cell polyomavirus in the human tissues from 41 Japanese autopsy cases using polymerase chain reaction. *Intervirology*. 2013;56(1):1-5, <http://dx.doi.org/10.1159/000338620>.
- 75-Hampras SS, Michel A, Schmitt M, Waterboer T, Kranz L, Gheit T, et al. Merkel cell polyomavirus (MCV) T-antigen seroreactivity, MCV DNA in eyebrow hairs, and squamous cell carcinoma. *Infect Agent Cancer*. 2015;10:35, <http://dx.doi.org/10.1186/s13027-015-0030-0>.

- 76- Pantulu ND, Pallasch CP, Kurz AK, Kassem A, Frenzel L, Sodenkamp S, et al. Detection of a novel truncating Merkel cell polyomavirus large T antigen deletion in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2010; 116(24):5280-4, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-02-269829>
- 77-Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras MT, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer*. 2009;125(6):1243-9, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24510>.
- 78-. Martel-Jantin C, Pedergnana V, Nicol JT, Leblond V, Trégouët DA, Tortevoeye P, et al. Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings. *J Clin Virol*. 2013;58(1): 288-91, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.004>
- 79-Fratini M, Di Bonito P, La Rosa G. Oncogenic Papillomavirus and Polyomavirus in Water Environments: Is There a Potential for Waterborne Transmission? *Food Environ Virol*. 2014;6(1):1-12, <http://dx.doi.org/10.1007/s12560-013-9134-0>.
- 80-Alam M, Bordeaux JS, YU SS. *Merkel cell carcinoma*. Springer: New York, 2013. 190p.
- 81-Tortora G J, Nielsen MT. *Princípios de anatomia humana*. 12ª edição. Guanabara-Koogan: São Paulo, 2013. 1110 p.
- 82-Gallego R, García-Caballero T, Fraga M, Beiras A, Forteza J. Neural cell adhesion molecule immunoreactivity in Merkel cells and Merkel cell tumours. *Virchows Arch*. 1995;426(3):317-21, <http://dx.doi.org/10.1007/BF00191370>.
- 83-Moll I, Paus R, Moll R. Merkel cells in mouse skin: intermediate filament pattern, localization, and hair cycle-dependent density. *J Invest Dermatol*. 1996;106(2):281-6, <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12340714>.
- 84-Tilling T, Moll I. Which are the cells of origin in merkel cell carcinoma? *J Skin Cancer*. 2012;2012:680410, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/680410>.
- 85-Visvader JE, Stingl J. Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev*. 2014;28(11):1143-58, <http://dx.doi.org/10.1101/gad.242511.114>.
- 86-Lemasson G, Coquart N, Lebonvallet N, Boulais N, Galibert MD, Marcorelles P, et al. Presence of putative stem cells in Merkel cell carcinomas. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(6):789-95, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04132.x>.
- 87-Zur Hausen A, Rennspiess D, Winnepenninckx V, Speel EJ, Kurz AK. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res*. 2013;73(16):4982-7, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0616>.
- 88-Liu W, Krump NA, MacDonald M, You J. Merkel Cell Polyomavirus Infection of Animal Dermal Fibroblasts. *J Virol*. 2018;92(4):e01610-17.
- 89 Shahzad N, Shuda M, Gheit T, Kwun HJ, Cornet I, Saidj D, et al. The T antigen locus of Merkel cell polyomavirus downregulates human Toll-like receptor 9 expression. *J Virol*. 2013;87(23):13009-19, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01786-13>
- 90-Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430(6996):257-63, <http://dx.doi.org/10.1038/nature02761>.
- 91-Griffiths DA, Abdul-Sada H, Knight LM, Jackson BR, Richards K, Prescott EL, et al. Merkel cell polyomavirus small T antigen targets the NEMO adaptor protein to disrupt inflammatory signaling. *J Virol*. 2013;87(24):13853-67, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02159-13>.
- 92-Chretien AS, Le Roy A, Vey N, Prebet T, Blaise D, Fauriat C, et al. Cancer-Induced Alterations of NK-Mediated Target Recognition: Current and Investigational Pharmacological Strategies Aiming at Restoring NK-Mediated Anti-Tumor Activity. *Front Immunol*. 2014;5:122, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00122>.
- 93-Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubber BS, Wang H, et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res*. 2013;1(1):54–63. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0034.
- 94-Miller NJ, Church CD, Fling SP, Kulikauskas R, Ramchurren N, Shinohara MM, Kluger HM, Bhatia S, Lundgren L, Cheever MA, Topalian SL, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus-specific immune responses in patients with Merkel cell carcinoma receiving anti-PD-1 therapy. *J Immunother Cancer*. 2018 Nov 27;6(1):131. doi: 10.1186/s40425-018-0450-7. PubMed PMID: 30482247; PubMed Central PMCID: PMC6258401.

- 95-Howard RA, Dores GM, Curtis RE, Anderson WF, Travis LB. Merkel cell carcinoma and multiple primary cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(8):1545-9, <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0895>.
- 96-Koljonen V, Kukko H, Tukiainen E, Böhling T, Sankila R, Joensuu H, et al. Second cancers following the diagnosis of Merkel cell carcinoma: a nationwide cohort study. *Cancer Epidemiol.* 2010;34(1):62-5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2009.12.007>.
- 97-Bzhalava D, Bray F, Storm H, Dillner J. Risk of second cancers after the diagnosis of Merkel cell carcinoma in Scandinavia. *Br J Cancer.* 2011; 104(1):178-80, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6605989>.
- 98-Miller RW, Rabkin CS. Merkel cell carcinoma and melanoma: etiological similarities and differences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8(2):153-8.
- 99-Kaae J, Hansen AV, Biggar RJ, Boyd HA, Moore PS, Wohlfahrt J, et al. Merkel cell carcinoma: incidence, mortality, and risk of other cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(11):793-801, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djq120>.
- 100-Satter EK, Derienzo DP. Synchronous onset of multiple cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinomas localized to the scalp. *J Cutan Pathol.* 2008;35(7):685-91, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0560.2007.00874.x>.
- 101-Thakur S, Chalioulias K, Hayes M, While A. Bilateral primary Merkel cell carcinoma of the upper lid misdiagnosed as Basal cell carcinoma. *Orbit.* 2008;27(2):139-41, <http://dx.doi.org/10.1080/01676830701556715>.
- 102-Schrama D, Thiemann A, Houben R, Kähler KC, Becker JC, Hauschild A. Distinction of 2 different primary Merkel cell carcinomas in 1 patient by Merkel cell polyomavirus genome analysis. *Arch Dermatol.* 2010;146(6):687-9, <http://dx.doi.org/10.1001/archdermatol.2010.121>.
- 103-Ahronowitz IZ, Daud AI, Leong SP, Shue EH, Bastian BC, McCalmont TH, et al. An isolated Merkel cell carcinoma metastasis at a distant cutaneous site presenting as a second 'primary' tumor. *J Cutan Pathol.* 2011; 38(10):801-7.
- 104-Pollock J, Caranosos T, Polack EP. Metachronous merkel cell carcinoma: a case report. *Case Rep Dermatol.* 2011;3(3):206-8, <http://dx.doi.org/10.1159/000333008>. 1
- 105-Kamiyama T, Ohshima N, Satoh H, Fukumoto H, Katano H, Imakado S. Metachronous Merkel cell carcinoma on both cheeks. *Acta Derm Venereol.* 2012;92(1):54-6, <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-1185>.
- 106-Harms PW. Update on Merkel Cell Carcinoma. *Clin Lab Med.* 2017; 37(3):485-501, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2017.05.004>.
- 107-Howley PM, Lowry DR. Papillomaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/ Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p.2299-354.
- 108-Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic .*Virology.* 2010 May 25;401(1):70-9. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002.
- 109-de Villiers EM, Gunst K. Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *J Gen Virol.* 2009;90:1999–2004.
- 110-Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo S, Broker TR, Stanley M. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012;30 Disponível em <10.13140/RG.2.2.35351.27046>.
- 111-Doorslaer KV, Li Z, Xirasagar S, Maes P, Kaminsky D, Liou D, Sun Q, Kaur R, Huyen Y, McBride AA. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database, *Nucleic Acids Research.* 2017;45:499–506. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw879>
- 112-Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist PG, Hansson BG. General acquisition of human papillomavirus infections of skin occurs in early infancy. *J Clin Microbiol.* 2003;41(6):2509-14, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.6.2509-2514.2003>.
- 113-De Koning MN, Weissenborn SJ, Abeni D, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S, Green AC, et al. Prevalence and associated factors of betapapillomavirus infections in individuals without cutaneous squamous cell carcinoma. *J Gen Virol.* 2009;90(Pt7):1611-21, <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.010017-0>.
- 114-Orth G. Genetics of epidermodysplasia verruciformis: insights into host defense against papillomaviruses. *Semin Immunol* 2006;18:362-74.
- 115-Pfister, H. Human papillomaviruses and skin cancer. *Semin. Cancer Biol.* 1992;3: 263–271.

- 116-Orth, G. Epidermodysplasia verruciformis. The papovaviridae. In: N. P. Salzman and P. M. Howley (eds.), *The Papillomaviruses*, pp. 199–235. New York: Plenum Press, 1987.
- 117-Chahoud J, Semaan A, Chen Y, Cao M, Rieber AG, Rady P, Tyring SK. Association between β -genus human papillomavirus and cutaneous squamous cell carcinoma in immunocompetent individuals—ameta-analysis. *JAMA Dermatol.* 2016;152(12):1354–1364.
- 118-Baez CF, Gonçalves MTV, da Rocha WM. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38;1129. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03508-z>
- 119-Akgül B, García-Escudero R, Ghali L, Pfister HJ, Fuchs PG, Navsaria H, et al. The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res.* 2005;65(6):2216–23, <http://dx.doi.org/10.1158/00085472.CAN-04-1952>
- 120-Schwarz T. Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *The Keio Journal of Medicine.* 2005;54(4),165–171.0022-9717, <https://doi.org/10.2302/kjm.54.165>,
- 121- Nadhan KS, Larijani M, Abbott J, Doyle AM, Linfante AW, Chung CL. Prevalence and Types of Genital Lesions in Organ Transplant Recipients. *JAMA Dermatol.* 2018 Mar;154(3):323–329. doi: 10.1001/jamadermatol.2017.5801. Epub 2018 Jan 31. PubMed PMID: 29387873; PubMed Central PMCID: PMC5885815.
- 122-McCaffrey, L.M.; Macara, I.G. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 2011;21:727–735
- 123-Kirschner N, Hafter M, Niessen CM, Behne MJ, Furuse M, Moll L, Brandner JM. CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 2011;131:932–943
- 124-Meinke P, Nguyen TD, Wehnert MS. The LINC complex and human disease. *Biochem Soc Trans.* 2011;39:1693–1697.
- 125-Banks L, Pim D, Thomas M. Human tumor viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2012;12:877–886.
- 126-Facciuto F, Bugnon Valdano M, Marziali F, Massimi P, Banks L, Vavatora AL, Gardiol D. Human papillomavirus (HPV)-18E6 oncoprotein interferes with epithelial cell polarity Par3 protein. *Mol Oncol.* 2014;8(3):533–543
- 127-Carrillo D, Munoz JP, Huerta H, Leal G, Corvalan A, Leon O, Calaf GM, Urzua U, Boccardo E, Tapia JC, Aguayo F. 2017. Upregulation of PIR gene expression induced by human papillomavirus E6 and E7 in epithelial oral and cervical cells. *Open Biol* 7:170111. doi:10.1098/rsob.170111.
- 128-Jung YS, Kato I, Kim HR. A novel function of HPV16–E6/E7 in epithelial mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;435:339–344.
- Termina introdução
- 129- Shi S.R., Cote R.J., Wu L. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J. Histochem. Cytochem.* 2002;50:1005–1011.
- 130- Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug;86(16):6230–4. doi: 10.1073/pnas.86.16.6230. PubMed PMID: 2762325; PubMed Central PMCID: PMC297811.
- 131- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 4):1057–62. 10.1099/0022-1317-76-4-1057 .
- 132- Sanguinetti CJ, Dias Neto, E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17: 915–919.
- 133-Schmitt A, Harry JB, Rapp B, Wettstein FO, Iftner T. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J Virol.* 1994;68(11):7051–9.
- 134- Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 1991;204:63–113. doi: 10.1016/0076-6879(91)04006-A

- 135- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rochas J, Antunes CM, Pene SD J. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS*.2003;100:177-182.
- 136- Tanaka Y, Sano T, Qian ZR, et al. Expression of adhesion molecules and cytokeratin 20 in Merkel cell carcinomas. *Endocr Pathol*. 2004;15:117.
- 137- Knapp CF, Sayegh Z, Schell MJ, Rawal B, Ochoa T, Sondak VK, Messina JL. Expression of CXCR4, E-cadherin, Bcl-2, and survivin in Merkel cell carcinoma: an immunohistochemical study using a tissue microarray. *Am J Dermatopathol*. 2012;34(6):592-6. doi: 10.1097/DAD.0b013e31823e25d3. PubMed PMID: 22814318; PubMed Central PMCID: PMC4634647.
- 138- Han AC, Soler AP, Tang CK, Knudsen KA, Salazar H. Nuclear localization of E-cadherin expression in Merkel cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 124:1147–1151, 2000.
- 139- Gaur, N., Tikla, T. & Kaul, R. *Arch Virol* (2019) 164: 91. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4060-y>.
- 140- Blackmon AM, Como CN, Bubak AN, Mescher T, Jones D, Nagel MA. Varicella Zoster Virus Alters Expression of Cell Adhesion Proteins in Human Perineurial Cells via Interleukin 6, *The Journal of Infectious Diseases*, , jiz095, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz095>
- 141- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007;7:415–28.
- 142- Kieny A, Cribier B, Meyer N, Velten, M, Jégu J, Lipsker, D. Epidemiology of Merkel cell carcinoma. A population-based study from 1985 to 2013, in northeastern of France. *Int. J. Cancer*.2019;144: 741-745. doi:10.1002/ijc.31860
- 143- Jin H, Morohashi S, Sato F, Kudo Y, Akasaka H, Tsutsumi S, Ogasawara H, et al..Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. *Biomed Res*. 2010;31:105–12.
- 144- Greet, C.E., J.K. Lund, and M.M. Manos. 1991. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: Recommendations on fixatives for long term storage and prospective studies. *PCR Methods Applic*. 1" 46-50.
- 145- Leroux-Kozal V, Leveque N, Brodard V, Lesage C, Dudez O, Makeieff M, et al. Merkel cell carcinoma: histopathologic and prognostic features according to the immunohistochemical expression of Merkel cell polyomavirus large T antigen correlated with viral load. *Hum Pathol* 2015;46:443e53
- 146- Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, Martinez-Fernandez A, Barletta JA, Bellizzi AM, Sadasivam S, Holloway DT, Cooper DJ, Kupper TS, Wang LC, DeCaprio JA. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest*. 2012 Dec 3;122(12):4645-53. doi: 10.1172/JCI64116. Epub 2012 Nov 1. PubMed PMID: 23114601; PubMed Central PMCID: PMC3533549.
- 147- Neto, C. F., Oliveira, W. R., Costa, P. V., Cardoso, M. K., Barreto, P. G., Romano, C. M. and Urbano, P. R. (2019), The first observation of the association of Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma in Brazil. *Int J Dermatol*, 58: 703-706. doi:[10.1111/jid.14325](https://doi.org/10.1111/jid.14325)
- 148- Moshiri AS, Doumani R, Yelistratova L, Blom A, Lachance K, Shinohara MM, Delaney M, Chang O, McArdle S, Thomas H, Asgari MM, Huang ML, Schwartz SM, Nghiem P. Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma: A More Aggressive Subtype Based on Analysis of 282 Cases Using Multimodal Tumor Virus Detection. *J Invest Dermatol*. 2017 Apr;137(4):819-827. doi: 10.1016/j.jid.2016.10.028. Epub 2016 Nov 1. PubMed PMID: 27815175; PubMed Central PMCID: PMC5565758.
- 149- Jiang, J., Li, X., Yin, X., Zhang, J., Shi, B. Association of low expression of E-cadherin and β -catenin with the progression of early stage human squamous cervical cancer. *Oncology Letters* 17, no. 6 (2019): 5729-5739. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10266>
- 150- Kouzmina, M., Häyry, V., Leikola, Haglund C, Böhling T, Koljonen V, Hagström J. BMI1 expression identifies subtypes of Merkel cell carcinoma. *Virchows Arch*.2012;461:647. <https://doi.org/10.1007/s00428-012-1327>