

**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

## 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 significates 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

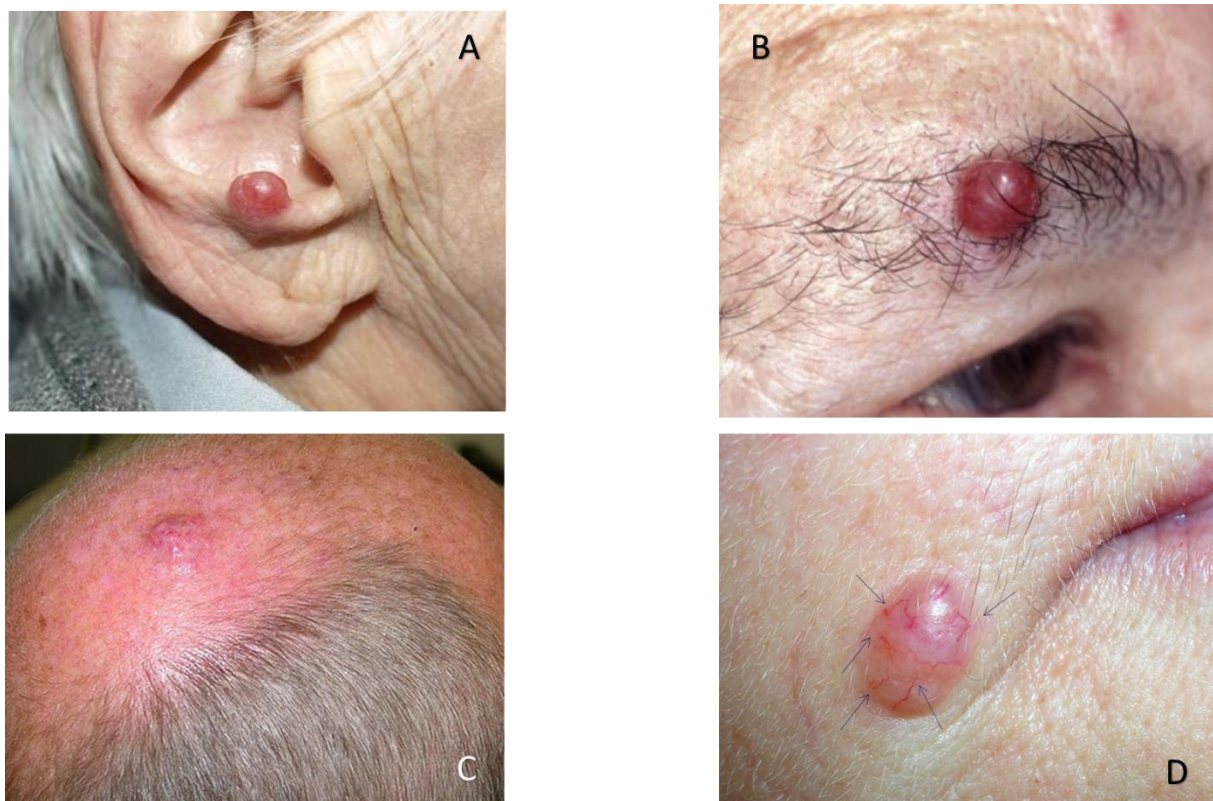
**Keywords:** DNA vírus. Skin Cancer. Sequencing

## 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,  $\leq 3$  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](http://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.

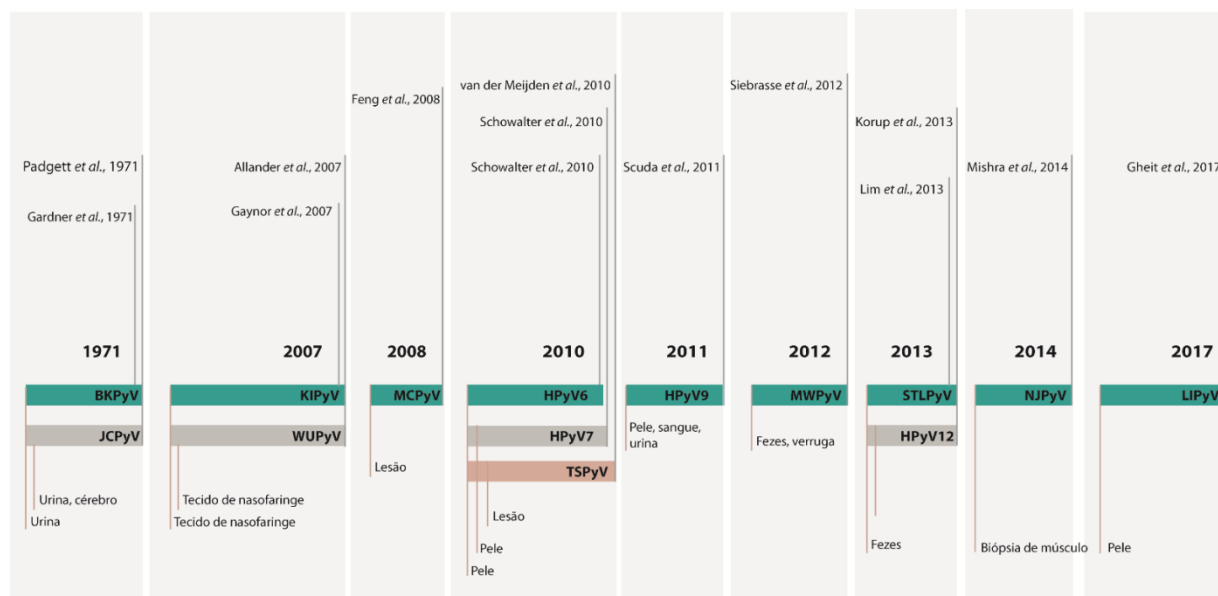
A identificação dos diversos poliomavírus que infectam humanos ocorreu em momentos tecnológicos distintos que permitiram uma crescente sensibilidade de detecção. Conforme descrito na tabela 01, é mostrado o momento do isolamento do HPyV, material de origem da amostra e a técnica usada para tanto.

**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 <sup>@</sup>	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

<sup>@</sup> 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.

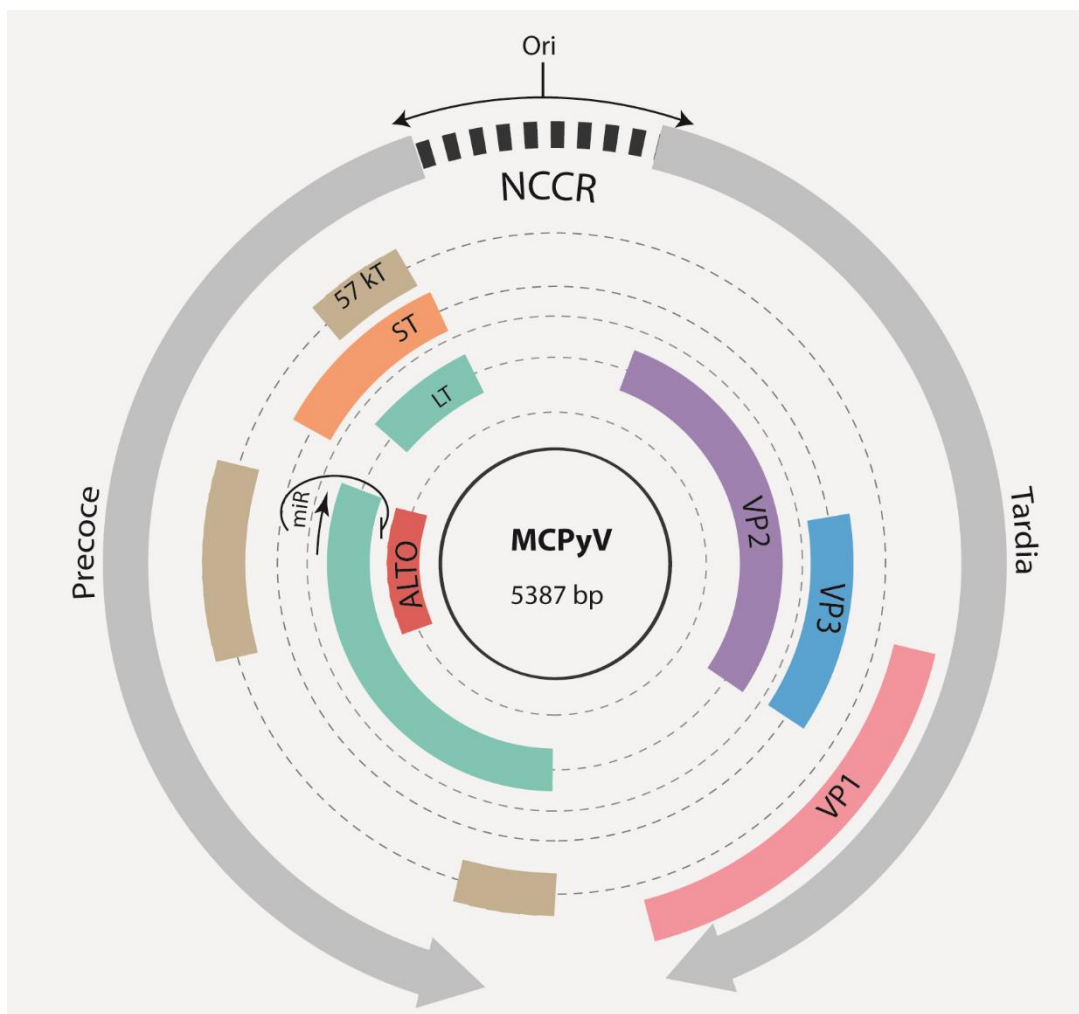
#### 1.4. Poliomavírus de células de Merkel (MCPyV).

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.

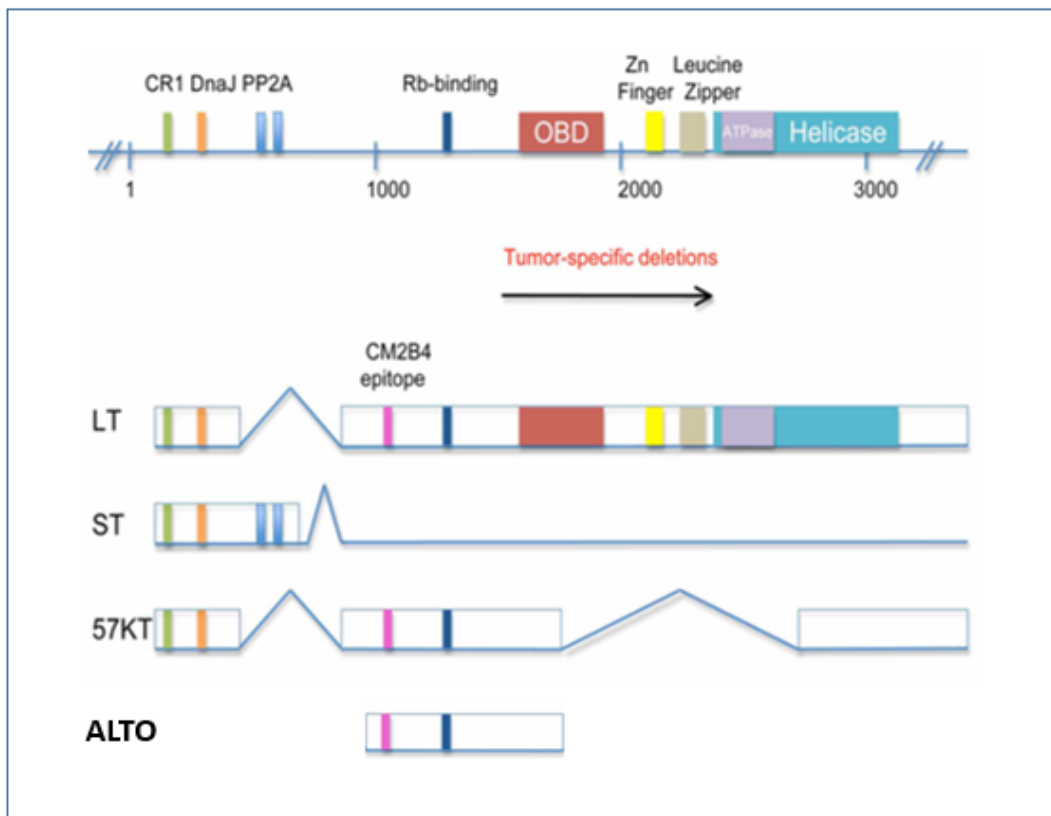
##### 1.4.1. Biologia do MCPyV.

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.**

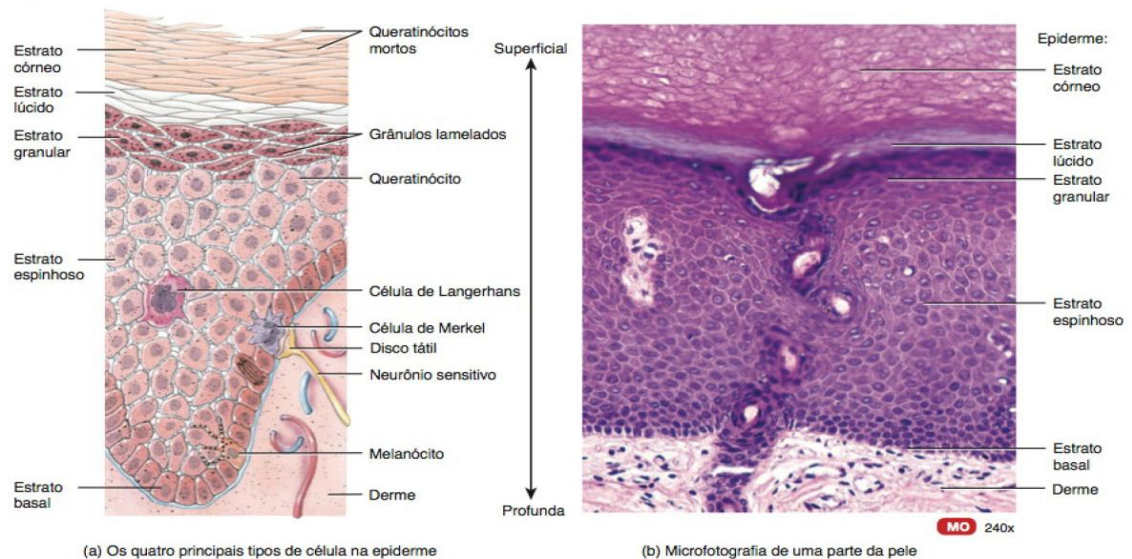
O estudo da presença do MCPyV na população humana normal sugere que ele faz parte da microbiota da pele (65). O contato com o vírus ocorre logo nos primeiros anos de vida. Estudos sorológicos mostram positividade de 20% a 40% em crianças de até cinco anos de idade, atingindo uma positividade de 80% em 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 $\beta$  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- $\gamma$  (NF- $\kappa$ B *essential modulator*, modulador essencial de NF- $\kappa$ 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).

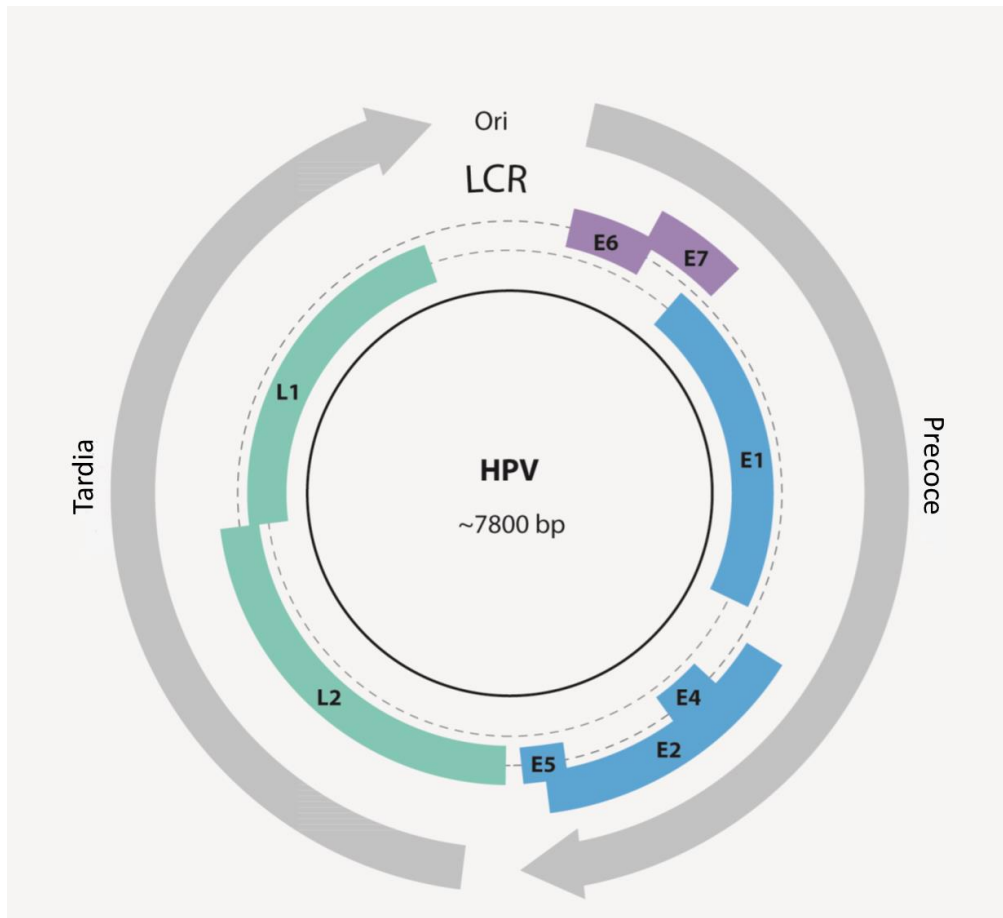
### 1.7. Os papilomavírus humano.

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/>).

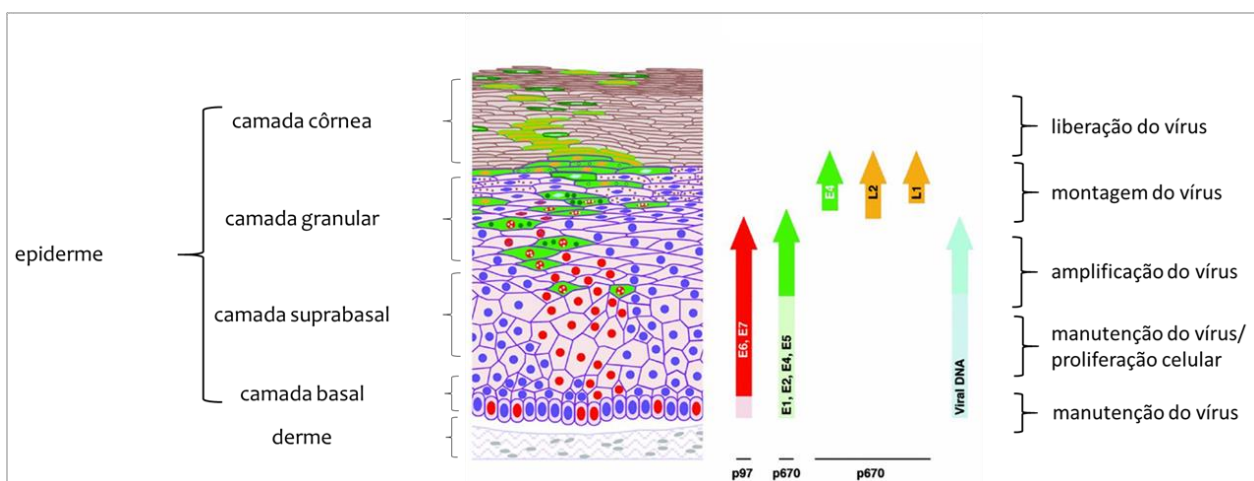
Assim como encontrado no HPyV o genoma do HPV é dividido em três regiões funcionais distintas e como nos HPyV, essas regiões apresentam fases temporais distintas de expressão. Assim, no HPV temos uma região precoce, onde usamos a letra E (“early”, do inglês precoce), região tardia L (do inglês, “Late”) 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  $\beta$ -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.

## 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.

## 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-Youlten 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, Kaneshashi 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, 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>.
- 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, Winnepeninckx 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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>