



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
FACULTAD DE MEDICINA.
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN.**
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA.

**“ESPECTRO MORFOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICA
DEL CARCINOMA DE CÉLULAS DE MERKEL”**

TESIS DE POSGRADO QUE PRESENTA LA:
DRA. CRISTINA VERONICA TRINIDAD ESPARZA
PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO ESPECIALISTA EN:
ANATOMÍA PATOLÓGICA.

ASESOR DE TESIS: DR. ARMANDO GAMBOA DOMINGUEZ

Facultad de Medicina

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX; FEBRERO DE 2023.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

CIUDAD DE MÉXICO, A 02 DE FEBRERO DE 2023
No. OFICIO MCONTROL-136/2023
REG. CONBIOÉTICA-09-CEI-011-20160627

DR. ARMANDO GAMBOA DOMINGUEZ
INVESTIGADOR PRINCIPAL
DEPTO. DE PATOLOGÍA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN, SALVADOR ZUBIRÁN
VASCO DE QUIROGA No. 15, COL. SECCIÓN XVI,
CP 14080, ALCALDIA TLALPAN, CDMX
P R E S E N T E

Por este medio, nos permitimos informarle que el *Comité de Investigación*, así como el *Comité de Ética en Investigación* del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, han revisado y aprobado el Protocolo de Investigación Clínica, titulado:

"Espectro morfológico e inmunohistoquímica del carcinoma de células de Merkel"
Versión febrero 2023
REF. 4464

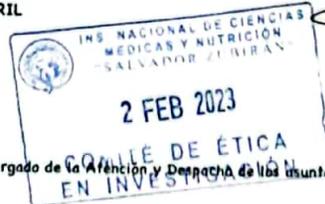
La vigencia de la aprobación termina el día 02 de febrero de 2024. Si la duración del estudio es mayor tendrá que solicitar la re-aprobación anual del mismo, informando sobre los avances y resultados parciales de su investigación e incluyendo todos los datos sobresalientes y conclusiones.

POR FAVOR CUANDO TERMINE EL PROTOCOLO DEBERÁ ENVIAR CARTA DE AVISO DE CONCLUSIÓN.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.


DR. CARLOS A. HINOJOSA BECERRIL
PRESIDENTE
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN

ATENTAMENTE,




DR. SERGIO C. HERNÁNDEZ JIMÉNEZ
PRESIDENTE
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

c.c.p. Dr. Carlos A. Hinojosa Becerril, Encargado de la Atención y Despacho de los asuntos de la Dirección de Investigación.

CAHB/SHJ/MRG

Avenida Vasco de Quiroga No. 15 Colonia Belsario Domínguez Sección XVI Alcaldía Tlalpan
C.P. 14080 Ciudad de México Tel. 55 54 87 09 00 www.incmnsz.mx



ÍNDICE

1) MARCO TEÓRICO.....	3
2) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3) JUSTIFICACIÓN.....	16
4) PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
5) OBJETIVOS.....	17
6) HIPÓTESIS.....	18
7) MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
• 7.1 Características clínicas	
• 7.2 Morfología	
• 7.3 inmunohistoquímica	
• 7.4 PCR	
• 7.5 Secuenciación tipo Sanger	
8) RESULTADOS.....	19
8.1 Características clínicas	
8.2 Morfología	
8.3 Histología	
8.4 Inmunohistoquímica	
8.5 PCR y secuenciación tipo Sanger	
9) DISCUSIÓN.....	44
10) CONCLUSIONES.....	47
11) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1.MARCO TEORICO

Definición

El carcinoma de células de Merkel (CCM) es un tumor neuroendocrino primario de piel extremadamente raro [1]. El CCM se describió por primera vez como un carcinoma trabecular de origen ecrino en 1972 por Cyril Toker [2]. Sin embargo, se detectó la presencia de gránulos neurosecretorios dentro de las células neoplásicas, similares a las que caracterizan a las células de Merkel normales. Por lo tanto, el tumor cambio de nombre a CCM [3]; sin embargo, la histogénesis de este tumor es controvertida hasta la fecha.

El CCM es más común en hombres y personas mayores de piel blanca con exposición solar crónica. Además, el riesgo de desarrollar MCC aumenta en pacientes inmunocomprometidos. Pacientes con leucemia linfocítica crónica, VIH/SIDA, tratamiento médico para enfermedades autoinmunes, trasplante de órganos sólidos y otros tipos de cáncer [4-6].

El CCM típicamente se presenta como una lesión eritematosa de crecimiento rápido en la capa dérmica de la piel [4-6]. El acrónimo AEIOU representa 90% de todas las presentaciones del CCM: asintomática, expansión rápida, inmunosuprimidos, mayores de 50 años y exposición a radiación ultravioleta (UV) [7]. Además del rápido crecimiento local, la progresión sistémica del tumor también es rápida. De hecho, CCM con frecuencia da metástasis a ganglios linfáticos y órganos distales, incluidos hígado, huesos, páncreas, pulmones y cerebro [4-6]. Como los pacientes suelen ser ancianos y el potencial metastásico es alto, el pronóstico es pobre [4-6], por ello, el diagnóstico precoz es fundamental.

Hay dos formas de CCM con presentación clínica y pronóstico similar, pero con etiología diferente. Una forma es causada por la integración en el ADN del

paciente del poliomavirus de células de Merkel (**MCPyV**) que conduce a la expresión persistente de las proteínas virales. El MCPyV es un virus de ADN humano de doble cadena sin envoltura detectado e implicado en la patogénesis del CCM. La otra forma se desencadena por extensas mutaciones en el ADN debidas a la radiación ultravioleta, sin embargo, ambas tienen en común las vías moleculares afectadas, la vía de P53 y RB1. Ambas formas muestran características inmunogénicas, lo que las convierte en objetivos interesantes para la inmunoterapia **[8]**.

Epidemiología

La incidencia de CCM no está bien definida debido a su rareza y a la escasez de grandes análisis retrospectivos internacionales **[9]**. Generalmente las estimaciones de incidencia de CCM se basan en estudios de casos y en revisiones de un solo país. En Europa, por ejemplo, se estima que el CCM representa menos del 1% de todas las neoplasias malignas cutáneas y en los EE.UU, se notifica anualmente 1500 casos de CCM **[10-11]**.

De manera similar a otros cánceres, las tasas de incidencia del CCM en Queensland, Australia Occidental y Nueva Zelanda son más altas en comparación con otros países (incidencia ajustada por edad de 1.6, 0.82 y 0.88 por 100 000 por año, respectivamente) **[12-14]**. En Asia, las estimaciones de incidencia son más bajas en comparación con otros países, y principalmente en base a algunos informes de casos publicados **[15-16]**.

La incidencia informada de CCM está aumentando con el tiempo en todo el mundo y esto podría ser atribuido a diferentes factores, como mejoras en el registro del cáncer y la caracterización inmunohistoquímica y una mayor coincidencia de los médicos sobre este tipo de cáncer **[17]**. En EE. UU, la incidencia ajustada por edad aumentó de 0.15 a 0.44 por 100 000 por año de 1986 a 2004. Además, un estudio danés informó un aumento de 5.4 veces desde 1986 hasta 2003 **[18-19]**. Se ha informado la duplicación en la incidencia de CCM de 1998 a 2010 y de 1993 a 1997 se ha informado en Alemania y los Países Bajos, respectivamente **[20-21]**.

La ocurrencia del CCM es mayor en hombres que en mujeres, como se informó en los EE.UU, Alemania, Australia y Nueva Zelanda [13,20]. Es más frecuente en blancos versus no blancos. De hecho, se ha informado una tasa de incidencia ajustada por edad ocho veces mayor en poblaciones blancas versus negras [9,22,23]. Las personas mayores presentan mayor riesgo de CCM mientras que el CCM es extremadamente raro en niños [24-26]. En un estudio basado en población de 1985 a 2013 realizado en el noreste de Francia, el 74% de los casos de CCM ocurrieron en personas mayores de 70 años [27].

Hasta la fecha no es posible determinar la incidencia de CCM en los países de América Latina pues no existen registros nacionales ni estudios de base poblacional sobre los casos de carcinoma de células de Merkel. Las fuentes de información disponibles corresponden a reportes o series de casos. La serie más larga corresponde a 36 casos registrados en un hospital de Colombia en un periodo de 10 años cuyo análisis no discrepa del todo con la información ya conocida sobre esta entidad. La mayoría presentes en zonas expuestas al sol, en cabeza y cuello, especialmente en cara (25%) y con positividad a la reacción para marcadores neuroendocrinos en combinación de CK20 (93.8%) [28]. La diferencia se marca en la zona de aparición en relación al género pues se demostró mayor frecuencia de aparición en extremidades en mujeres que en hombres con un 25% de casos en extremidades inferiores y superiores en mujeres en comparación a 0% y 5% respectivamente en hombres. Aunque la diferencia no es mucha en razón a estudios anteriores se hipotetiza que la razón puede estar asociada al tipo de vestimenta de países tropicales [29].

En México existe data de tan solo y como suma 17 casos en cuatro instituciones entre los años 1999 y 2019. La mayoría de ellos se presentaron en el segmento cefálico y recibieron como tratamiento escisión amplia más radioterapia con o sin quimioterapia. Siete de ellos no se cuenta con información sobre la evolución, pero de los 10 restantes, cuatro presentaron recurrencia, dos de los cuales ya tenían metástasis ganglionar, uno recibió desde el inicio manejo paliativo y los cinco restantes se mantuvieron asintomáticos en su seguimiento. Aunque los datos no

difieren de lo descrito en la literatura llama la atención las zonas anatómicas atípicas reportadas como en etmoides y en zona retroperitoneal [30-33].

Características clínicas

El CCM se manifiesta como un nódulo cutáneo firme, indoloro, de rápido crecimiento, de color rojo-violeta, en forma de cúpula. Generalmente se localiza en zonas expuestas al sol como la cabeza y el cuello y con menos frecuencia, las extremidades y las nalgas [9,34,35]. La ulceración es poco frecuente y el CCM rara vez se presenta con lesiones múltiples que surgen en diferentes sitios del cuerpo [36]. Debido a sus características inespecíficas, el diagnóstico diferencial debe plantearse con lesiones benignas (es decir, quistes, espinillas, dermatofibromas, lipomas) o tumores malignos como el melanoma, linfoma, tumores anexiales malignos, carcinoma sebáceo, sarcoma de Ewing y metástasis cutánea de otros tumores. El acrónimo AEIOU podría ayudar a guiar a los médicos hacia el diagnóstico correcto, pero el examen histológico es esencial para confirmarlo. En el caso de un nódulo solitario, firme, de color carne a rojo con una superficie lisa y brillante, generalmente en áreas expuestas al sol, los médicos deben considerar el diagnóstico de CCM.

Dado que el CCM se propaga primero a los ganglios linfáticos, una biopsia de ganglio linfático centinela (SLNB, por sus siglas en inglés) debe realizarse como un procedimiento de estadificación [26,37]. De hecho, en ciertos casos, no hay evidencia del tumor cutáneo primario y CCM se reconoce sólo después de escisión de ganglios linfáticos agrandados. Además de los ganglios linfáticos regionales, las metástasis de CCM podría estar localizado en la piel, ganglios linfáticos distantes, pulmones, glándulas suprarrenales, páncreas, hígado, cerebro y huesos. La clasificación por etapas y los grupos de etapas pronósticas para CCM se basan en la AJCC 8ª edición [17,38-42].

Histogénesis

Se sugiere que las células madre epiteliales representen los progenitores más probables de las células de Merkel diferenciadas, por lo tanto siendo este el origen más probable de las células del carcinoma de células de Merkel [42]. A pesar que uno de los argumentos en contra del origen epitelial es su falta de conexión epidérmica se han reportado casos en los que existe especial relación con la epidermis en yuxtaposición o en forma de franco epidermotropismo, especialmente en aquellos casos asociados a radiación UV con estatus negativo al virus. Agregado a esto también se reportó la asociación de carcinoma de células de merkel con carcinoma epidermoide in situ en varias series [43-44].

Se propone que los casos positivos para MCPyV podrían derivar de células pre/pro B considerando la positividad a marcadores de células B (TDT y PAX5), su asociación epidemiológica con neoplasias B así como su falta de conexión epidérmica. Que aunque sean o no provenientes de este origen, ante la positividad de estos marcadores se hace hincapié en la importancia de hacer el diagnóstico diferencial con infiltración leucémica, especialmente en estados comorbidos.

Otra hipótesis para los casos positivos para MCPyV es que estos deriven de células mesenquimales dérmicas. Esta hipótesis se basa en el reconocimiento de los fibroblastos dérmicos como adecuados hospederos de la infección por MCPyV [45], su morfología sin conexión epidérmica así como la baja carga mutacional del tumor y falta de firma UV [46]. Finalmente, en recientes fechas se demostró que la desactivación de la oncoproteína MCPyV en líneas celulares de MCC conduce a la adquisición de un fenotipo neuronal diferenciado en ciertos contextos podría indicar que MCC en realidad podría derivar de un linaje neuronal [47].

Características histopatológicas

El diagnóstico requiere una evaluación microscópica ya que la apariencia clínica es inespecífica y puede simular una variedad de lesiones cutáneas benignas y

malignas. La distinción entre CCM cutáneo primario y metástasis de carcinoma neuroendocrino en la piel también requiere análisis inmunohistoquímico [9]. En el examen histológico, el CCM aparece como un tumor infiltrante con crecimiento expansivo nodular o difusa dentro de la dermis y variablemente en tejido subcutáneo. El tumor presenta una variable mezcla de nódulos, láminas, nidos y trabéculas de células neoplásicas. Un componente intraepidérmico esta ocasionalmente presente. Las células de CCM tienen células tumorales pequeñas, redondas y azules con una relación núcleo-citoplasma alta, núcleos redondos/ovalados, cromatina finamente dispersa (sal y pimienta), nucléolos indistintos y citoplasma escaso.

Las características morfológicas y citológicas de esta neoplasia se han podido relacionar con la presencia o ausencia de poliomavirus de carcinoma de células de Merkel, por ejemplo en un estudio retrospectivo de 20 casos se identificó que la presencia de ulceración/ hiperqueratosis predijo la presencia de MCPyV negativo (80% de los casos) CCM combinado (50% de los casos) y ninguno de los casos MCPyV positivo presentó este cambio morfológico [48]. Hay asociación estadísticamente significativa a la presencia de núcleos redondos, células pequeñas y poco citoplasma con los casos positivos para MCPyV, mientras que células grandes, citoplasma claro, núcleos elongados, nucléolos visibles y formación de rosetas fue asociado significativamente y por separado a la negatividad para MCPyV [44].

Así mismo es importante mencionar que, aunque de manera infrecuente este tumor puede existir con diferenciación divergente. Hasta la fecha solo como informes de caso y series cortas en las que se ha demostrado diferenciación con elementos ecrinos, escamosos, rabdomioblasticos, sarcomatosos, leiomiomasarcomatosos y neuroblasticos [30,43].

Inmunohistoquímica

La citoqueratina 20 (CK 20) positiva se usa actualmente para distinguir los carcinomas de células de Merkel de otros carcinomas neuroendocrinos. Sin

embargo, esta distinción puede ser un desafío en casos CK 20 negativos y en casos sin tumor cutáneo primario, ganglionares, por ejemplo).

En un estudio retrospectivo en el cual se compararon 80 casos virus positivo y 21 casos virus negativo, *Kervarrec et al.* demostraron un cierto patrón constante y distintivo de reacciones de inmunohistoquímica según el estatus del virus. En los casos virus negativos las reacciones positivas fueron al factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1), citoqueratina 7, expresión de p53 con patrón mutado y falta de expresión de neurofilamento; por el contrario, se identificaron como rasgos característicos del carcinoma de células de Merkel virus positivo la citoqueratina 8/18, 20, EMA y CD99 en patrón de punto paranuclear, especialmente este último con una sensibilidad de 81% especificidad del 90% e índice de probabilidad de 8.08. Tomando en cuenta la positividad para CD99 y de su coexpresión con FLI-1 demostrada en otras series, se ha hecho hincapié en la interpretación errónea en el diagnóstico diferencial con otros tumores de células pequeñas redondas y azules [35].

Diagnóstico diferencial

De manera clásica el diagnóstico diferencial de esta neoplasia se basará por su aspecto morfológico de células redondas y azules con distribución dérmica, entre ellos se destacan tumores epiteliales cutáneos de células pequeñas (carcinoma de células escamosas de células pequeñas, carcinoma de células basales o carcinoma de glándula sudorípara) melanoma, sarcoma de Ewing, linfoma/leucemia y en particular carcinomas neuroendocrinos metastásicos.

Datos orientativos que caracterizan al carcinoma de células basales son las islas tumorales con empalizada periférica y retracción estromal, estroma mixoide y por supuesto gemación desde la base epidérmica. Los casos que muestran evidencia de formación de conductos pueden sugerir carcinoma de glándulas sudoríparas, mientras que la presencia de pseudorosetas plantea la posibilidad de neuroepitelioma periférico. Los detalles nucleares son importantes para hacer un diagnóstico de CCM. Los núcleos de estos tumores suelen mostrar contornos

redondeados y cromatina finamente dispersa. Cuando estas características nucleares están presentes brindan una evidencia particularmente sólida contra el melanoma, el linfoma o los tumores epiteliales cutáneos de células pequeñas. El moldeado de células tumorales y la evidencia de diferenciación ecrina o escamosa, si está presente, argumentan aún más en contra del melanoma maligno, al igual que la ausencia de proliferación de células intraepidérmicas o unión lateral a la masa tumoral principal, como ya se ha mencionado. Las conexiones amplias con la epidermis generalmente favorecen el carcinoma de células escamosas, mientras que la empalizada periférica bien desarrollada de islotes tumorales es una característica de los carcinomas de células basales que no se observa en el CCM. A diferencia de CCM, los PNET pueden contener verdaderas rosetas de Homer Wright con material neurofibrilar central. Por otro lado, los carcinomas secundarios de células pequeñas que involucran la piel frecuentemente muestran el “Fenómeno de Azzopardi” **[49-52]**.

Adicionalmente puede hacerse uso de la inmunohistoquímica para confirmar el caso o descartar alguna de las neoplasias anteriores resaltándose aquí la positividad constante del CCM a CK20 en punto paranuclear, cromogranina, sinaptofisina, cd56, neurofilamento y en algunos casos al MCPyV. La evaluación de otros marcadores en conjunto con los anteriores como S100, HMB 45, CD99, TTF1 y marcadores hematolinfoides permitirá hacer diagnósticos diferenciales.

Desde hace mucho tiempo se sabe de la asociación entre la leucemia linfocítica crónica (LLC/SLL) y CCM. Este fenómeno epidemiológico se explica por inmunosupresión causada por la propia enfermedad o bien por la terapia aplicada. Sin embargo es de especial importancia reconocer que el propio CCM puede presentar algunos marcadores inmunohistoquímicos hematolinfoides que pueden representar un error diagnóstico en caso de evaluarse de manera aislada **[53-54]**.

La desoxinucleotido terminal transferasa (TdT) es una polimerasa de ADN que es un anticuerpo sensible y específico para la enfermedad linfoblástica aguda, linfoma con una pequeña proporción de leucemia mieloide aguda mostrando positividad **[55-58]**.

Estatificación y factores pronósticos

En la evaluación morfológica hay características que cobran importancia pronóstica según algunos estudios recabados, entre ellos se ha demostrado que la presencia de >10 figuras mitóticas por campo de alta potencia se correlaciona con un tumor de gran tamaño y mal pronóstico. Se recomienda dar el informe de mitosis por mm². Otro método recomendado como índice de proliferación es la medida en porcentaje de MIB-1 el cual es una proteína nuclear expresada en ciertas fases del ciclo celular, la cual se ha asociado a un pronóstico significativamente peor en porcentajes >50%. **[35,59]**. Existe evidencia sobre que el grosor del tumor es más predictivo del pronóstico que el diámetro máximo del tumor, un parámetro de estadificación actual. Este debe de indicarse en milímetros y hacer referencia a al menos cuantos milímetros mide desde el estrato granuloso hasta las células tumorales infiltrantes profundas. Agregado a esto también existe evidencia sobre el peso que tiene el patrón de infiltración pues en una serie de 156 pacientes con MCC se encontró que el patrón de crecimiento del tumor nodular se correlaciona con una mejor supervivencia en el análisis univariado y multivariado **[60,61]**. Según las guías actuales el patrón que tiene preferencia es el infiltrante, por lo que de encontrar ambos, es decir nodular e infiltrante deberá de reportarse este último. El patrón nodular se define como tumores con una superficie de contacto relativamente bien delimitada con el tejido circundante, típicamente compuesta por uno o múltiples nódulos. El patrón infiltrativo se define como tumores sin una interfaz bien delimitada con el tejido circundante, compuestos de células individuales, filas, trabéculas o hebras de células que se infiltran a través del colágeno dérmico o tejido blando más profundo.

Respecto a los linfocitos infiltrantes tumorales o TIL algunos autores han sugerido que se ha demostrado que la presencia de TIL predice un mal pronóstico especialmente cuando se encuentra en conjunto con una profundidad tumoral de > 5 mm. Este parámetro debe de medirse en la interfaz de tumor y el estroma y debe informarse como en el reporte estandarizado de melanomas cutáneos en

razón de la abundancia y distribución de los mismos como TIL no identificado, TIL identificado no energético o TIL energético [35,62].

Ante la asociación histológica entre CCM y carcinoma epidermoide in situ y la relación epidemiológica de este padecimiento con estados de inmunocompromiso especialmente neoplasias hematolinfoides se ha recomendado el informe de las segundas neoplasias concurriendo con CCM. En el primer caso asociado con múltiples mutaciones y correlación inversa con la detección del poliomavirus de células de Merkel y en el segundo con un probable mal pronóstico subyacente a la inmunosupresión asociada [63-64].

En la estadificación TNM la categoría de las metastasis ganglionares dependen de la información clínica y evaluación histológica realizada. Y dado que el CCM se propaga primero a los ganglios linfáticos, una biopsia de ganglio linfático centinela debe realizarse como un procedimiento de estadificación [26,37]. De hecho, en ciertos casos, no hay evidencia del tumor cutáneo primario y CCM se reconoce sólo después de escisión de ganglios linfáticos agrandados [17,38]. Para ello se clasificará como "micrometastasis" por la identificación de metástasis en el examen patológico de muestras de linfadenectomía centinela o regional. Las "macrometástasis" se definen como metástasis ganglionares clínicamente detectables, confirmadas mediante un examen anatomopatológico de muestras de linfadenectomía terapéutica. La metástasis en tránsito se define como un tumor distinto de la lesión primaria y ubicado entre la lesión primaria y el lecho del nódulo de drenaje o distal a la lesión primaria. Se recomienda que para la evaluación del ganglio linfático vale la pena realizar inmunohistoquímica antes de dar un resultado negativo [65].

Estructura, oncogénesis e identificación de poliomavirus de células de Merkel

El poliomavirus se ha asociado a cánceres humanos de manera innegable y desde el 2008 se ha demostrado su integración al genoma de las células tumorales del huésped en múltiples estudios.

El genoma prototipo del poliomavirus de células de Merkel es como la estructura general del resto, ADN circular de doble cadena de 5.387 pb. Este alberga una región de codificación temprana y otra tardía, separada por una región reguladora no codificante. Esta última contiene el origen de replicación y los promotores de ambas regiones. La región temprana contiene la secuencia que codifica los antígenos T tempranos, los cuales se expresan inmediatamente después de la infección y son necesarios para la replicación viral. La región tardía se expresa después de la replicación del ADN viral y es donde se codifican las proteínas estructurales necesarias para la producción del virión VP1-3.

En general *poliomaviridae* tiene un genoma pequeño incapaz de codificar enzimas para la replicación. La replicación viral se realiza mediante la carga del antígeno tumoral grande (LT) en la unión reguladora no codificante (NCCR) seguido de la replicación del reclutamiento de enzimas de replicación celular.

La región temprana de los poliomavirus contiene el locus del antígeno T el cual es responsable de la generación de al menos tres proteínas que son responsables de la transformación viral y actividades de tumorigénesis: el antígeno tumoral grande (LT), el antígeno T pequeño (ST) y 57 Kt.

La región tardía de *Poliomaviridae* codifica para VP1, VP2 y VP3. La expresión de VP1 y VP2 solos en células cultivadas se autoensamblan para producir partículas similares a virus (VLP) que contienen los principales antígenos virales. Esto es de especial importancia pues estos últimos pueden usarse en estudios serológicos para seguimiento. VP3 por su parte puede no ser funcional o no expresarse, de hecho se ha demostrado su poco agregado pues la adición de la expresión de

VP3 no afecto las partículas similares a virus, mientras que la adición de VP2 mejora la infectividad.

Respecto al tropismo del virus, hasta la fecha existen estudios en distintas poblaciones que confirman las secuencias del genoma de este virus en la mayoría de los tejidos de CCM, varios tejidos o fluidos no tumorales, piel y mucosas en sujetos sanos, de hecho se ha demostrado que el 80% de los adultos tienen IgG dirigida contra el antígeno VP1 de la capsida principal del virus y que la seroconversión se produce probablemente desde la infancia. A pesar de la alta prevalencia hasta la fecha no se han podido encontrar síntomas o signos que demuestren infección primaria y actualmente no se conoce ni la ruta de transmisión, los sitios de replicación primaria, latencia o excreción, aunque Feng et al. mostró la expresión de genes tempranos y tardíos y la producción de viriones después de la transfección de genomas MCV circulares en 293 células renales humanas embrionarias, lo que demuestra que estas células son permisivas para la replicación, sin embargo tanto la frecuencia de detección como las cantidades de ADN en estos sitios son bajas en comparación con las cifras encontradas en piel, lo que hace que se favorezca la hipótesis de que la piel es el sitio principal de excreción y probable transmisión del virus **[86-88]**.

Existen métodos directos e indirectos para la identificación del virus que están basados en reconocimiento de alguna de las proteínas que forman su estructura. En 2008 el grupo de Chang y Moore desarrolló un MoAb para residuos 116 a 129 del LT Ag (clon CM2B4), que tiene surgió como un marcador bastante sensible y altamente específico de MCC. En 8 estudios que incluyeron 313 MCC puros, LT Ag se expresó en el 60% y aunque hasta la fecha existen más trabajos publicados en los que se demuestra su positividad por encima del 70%, aun no existe una dilución ni método de interpretación homogeneizado, pues estos son muy variables, con diluciones 1:10-200 y con criterios de interpretación positiva desde cualquier tinción en cualquier porcentaje, por encima del 10%, 50% o puntuación Allred 2.

Es importante mencionar que se ha visto que e la inmunohistoquímica del antígeno T grande de SV40 (PAb416) no reacciona de forma cruzada con el antígeno T grande de MCPyV y, por lo tanto, no es reactivo en el carcinoma de células de Merkel. SC40 reconoce un epítipo dentro de los aminoácidos 83–128 del antígeno T grande de SV40, mientras que CM2B4 se encuentra contra los aminoácidos 116–129 del antígeno T grande de MCPyV y el clon CM2B4 reconoce un epítipo único en uno de estos tramos [89].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La incidencia de CCM no está bien definida debido a su rareza y a la escasez de grandes análisis retrospectivos internacionales. Generalmente, las estimaciones de incidencia de CCM se basan en estudios de casos y en revisiones de un solo país. En México se desconoce su incidencia y son escasos los estudios de CCM, los cuales se acotan a informes o series de casos en los cuales al igual que en el resto del mundo se demuestra pronóstico desfavorable.

Aunque es bien sabido que el desarrollo tumoral y fenotipo de las células tumorales surgen de alteraciones genéticas moleculares que ocurren antes o durante el desarrollo de un tumor, hasta la fecha sigue siendo problemático definir si las características morfológicas y genéticas reflejan la célula de origen de la neoplasia, de hecho, recientemente se pone en tela de juicio la teoría que se proponía respecto a la histogénesis del carcinoma de células de Merkel, pues se considera improbable que las células de Merkel sean el origen ya que estas son postmitóticas y se requiere un estado activo en el ciclo celular para la integración y transformación del virus, además existe evidencia donde la sobreexpresión ectópica de las oncoproteínas virales MCPyV en ratones transgénicos no logró inducir la reentrada en el ciclo celular en células de Merkel maduras. Por lo anterior, se han ofrecido otras células candidatas de origen incluidas células epiteliales y no epiteliales lo cual concuerda con los patrones de inmunohistoquímica que suelen ser heterogéneos, incluso en algunos pudiendo

condicionar dificultad para descartar diagnósticos diferenciales y concluyendo en diagnósticos tardíos o error diagnóstico

La asociación del carcinoma de células de Merkel con el *polyomavirus* es en al menos 80% de los casos informados mundialmente y se han determinado diferencias respecto a fisiopatología, características del paciente, comorbilidades, asociación con otras neoplasias adyacentes, localización, morfología, marcadores de inmunohistoquímica y pronóstico según el estatus del virus por lo que representa una pieza clave en el diagnóstico y clasificación de este tipo de neoplasia. Para ello se ha propuesto la identificación del mismo por métodos directos como PCR dirigida a varios de los fragmentos del virus, así como métodos indirectos como la inmunohistoquímica. De este último método se ha puesto mayor atención en el anticuerpo CM2B4 el cual ha resultado ser un método sensible y específico con reacción positiva por encima del 75% en más de 20 series de casos reportadas; sin embargo, llama la atención que varía mucho la dilución a la que se realiza la reacción así como el método de interpretación de este marcador, por lo que se asume que no es un marcador que actualmente se encuentre estandarizado y eso permite que se someta a exploración.

Tal información permite el tema como un desafío vigente y de importancia crítica, ya que tales hallazgos tienen implicaciones importantes para el abordaje diagnóstico, la propuesta de nuevas terapias y la implementación de programas de prevención en población específica.

3. JUSTIFICACIÓN:

Es importante demostrar la casuística de esta neoplasia en México, así como el panel de anticuerpos presente y la identificación del virus por varios métodos.

Los pacientes suelen ser ancianos con neoplasias asociadas o inmunocompromiso el potencial metastásico es alto y el pronóstico es pobre, por ello el diagnóstico y por lo tanto el tratamiento precoz es fundamental.

Es importante tomar en cuenta la variación morfológica y los marcadores aberrantes que se pueden expresar y condicionar un posible error diagnóstico y por lo tanto condicionar tratamiento tardío.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es la morfología y perfil de inmunohistoquímica en 17 casos de carcinoma de células de Merkel de pacientes mexicanos?

5. OBJETIVOS:

Objetivo principal:

Describir la morfología y panel de inmunohistoquímica ampliado 17 carcinomas de células de Merkel en pacientes mexicanos.

Objetivos específicos:

- 1) Evaluar el estatus de poliomavirus de células de Merkel mediante la expresión (localización, intensidad y porcentaje) de anticuerpo para proteína grande CM2B4 por inmunohistoquímica en biopsias de neoplasias pulmonares malignas en humanos y en pulmones de ratones sanos.
- 2) Evaluar el estatus de poliomavirus de células de Merkel mediante la amplificación (positivo o negativo) del antígeno T pequeño y T grande por PCR.

Objetivos exploratorios:

- 1) Describir la relación entre el estatus de poliomavirus con el panel ampliado de inmunohistoquímica.
- 2) Describir la relación entre el estatus de poliomavirus con la morfología histológica.

- 3) Describir el estatus de poliomavirus de carcinoma de células de Merkel por medio de inmunohistoquímica (CM2B4) evaluando localización, intensidad y porcentaje.
- 4) Describir el estatus de poliomavirus de carcinoma de células de Merkel mediante la amplificación (positivo/negativo) del antígeno T grande (PyV) y PV1 por PCR.

6. HIPÓTESIS:

La morfología histológica predominante del CCM será de células pequeñas, con núcleo redondo y escaso citoplasma.

El panel de inmunohistoquímica predominante será el clásico (CK+ perinuclear, TTF-1 -, cromogranina+, sinaptofisina +) con CM2B4+.

El estatus de poliomavirus es positivo por PCR en más del 80% de los casos de carcinomas de células de Merkel.

7. MATERIAL Y MÉTODOS:

-Diseño del estudio: Se trata de un estudio retrospectivo y observacional. Se utilizará estadística descriptiva: medidas de tendencia central (media/mediana) y dispersión (desviación estándar) para las variables continuas y frecuencias y porcentajes para variables nominales.

-Autorización por comités de ética: registro y aprobación del comité de ética.

-Lugares en donde se realizó el protocolo: Departamento de patología Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

-Duración del estudio: un año.

-Fuentes de información y muestras biológicas: archivos de bloques y laminillas del departamento de patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán e Instituto nacional de cancerología. Archivos clínicos digitales de los casos correspondientes a estudiar.

7.1 EVALUACION DE BIOPSIAS:

-Cálculo de tamaño de muestra: Tamaño de muestra por conveniencia, considerando que se trata de una patología rara de baja incidencia mundial y de incidencia desconocida en México:

$$\underline{n = 17}$$

-Criterios de inclusión, exclusión, eliminación:

a) Criterios de inclusión:

Todas las biopsias de pacientes con diagnóstico de carcinoma de células de Merkel que cuenten con bloques de parafina y laminillas teñidas en hematoxilina y eosina, así como reacciones de inmunohistoquímica que se encuentren en el archivo de Anatomía Patológica del INCMNSZ.

b) Criterios de exclusión:

1. Pacientes con otro tipo de neoplasia que no sea carcinoma de células de Merkel.
2. Pacientes que no cuenten con laminillas o bloques de parafina o material suficiente en el mismo.

c) Criterios de eliminación:

Casos que se encuentren incompletos para su valoración, por ejemplo, con laminillas dañadas y/o rotas, bloques de parafina sin tejido para análisis y cuando la inmunohistoquímica no sea valorable.

7.2 Método, evaluación e interpretación de información clínica:

A través del archivo electrónico y físico se obtendrán variables tales como la edad y sexo del paciente así como ubicación del tumor.

7.3 Método, evaluación e interpretación de morfología:

Se procederá a la revisión de laminillas teñidas en hie de cortes en parafina de tejido con diagnóstico de carcinoma de células de Merkel mediante dos observadores de manera independiente y posteriormente en conjunto de variables. Las variables a tomar en cuenta y su interpretación serán las siguientes: epidermotropismo (presente/ausente), ulcera (presente/ausente), Elastosis solar (presente/ausente), necrosis (presente/ausente), Patrón de crecimiento (difuso, trabecular, mixto), Patrón de infiltración (nodular, infiltrativo), índice mitótico (número de mitosis en 10 campos de alto poder), tamaño celular (pequeño, intermedio, grande), forma nuclear (redondo, elongado) volumen de citoplasma (poco, moderado, abundante), citoplasma claro (presente/ausente), nucleolo (presente/ausente), formación de rosetas (presente/ausente), neoplasia adyacente (presente/ausente).

7.4 Método, evaluación e interpretación de inmunohistoquímica:

Se realizarán cortes histológicos, en micrótopo a 4 micras, que se colocarán en laminillas cargadas, posteriormente se hidratarán los tejidos, para lograr esto se incubarán por 30 segundos en cada una de las siguientes soluciones (bajo estricto orden): en xilol 1, xilol 2, alcohol-xilol (1:1), etanol absoluto, etanol al 96% y agua destilada; para continuar con recuperación antigénica en buffer de citratos con pH 9, a temperatura alta en olla de presión, la peroxidasa endógena se bloqueará con H₂O₂-MeOH (9:1)/20 minutos, al finalizar se lavará con PBS Tween 20 (0.05%) este último lavado se realizará entre cada uno de los pasos que se describen a continuación. El bloqueo de inespecificidad se realizará con HCN durante 20 minutos. Tras la aplicación del anticuerpo en cuestión con su específica dilución y

control se utilizará como anticuerpo secundario HRP acoplada a estreptavidina y se dejará actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se agregará diaminobencidina disuelta en buffer DAB (1 gota en 1 mL de buffer). Vigilar el viraje de coloración (traslucido a café) y realizar lavado para detener la reacción, posteriormente se hará una contratincción con hematoxilina, para finalizar, cada laminilla se montará con resina y se analizará al microscopio, describiendo a grandes rasgos los tipos celulares marcados, así como las características e intensidad del mismo. Los anticuerpos de inmunohistoquímica a utilizar son los siguientes: CM2B4, CK20, Cromogranina, sinaptofisina, EMA, CK 8/18, P53, PAX5, CD5, CD99, TDT, CD117, TTF-1.

De manera semicuantitativa, se gradificó el nivel de inmunomarcaje por ubicación (nuclear, citoplásmico, membranoso, paranuclear), porcentaje e intensidad (medido en cruces +/++/+++) considerándose positivo ante cualquier porcentaje e intensidad de reacción con patrón nuclear en las células neoplásicas. Lo anterior fue realizado por dos observadores que evaluaron dichos parámetros de manera independiente y posteriormente en conjunto.

7.5 MÉTODO, EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE PCR

Extracción de ADN de tejido:

Se realizó la disección de 5 mm de tejido embebido en parafina, el cual se extendió en una laminilla y se colocó en un vaso coplin con xilol durante dos minutos para eliminar la parafina. La laminilla se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente (Fig 1).

Posteriormente se realizó la macrodisección de tejido que contenía al menos un 70% de células tumorales. Las células fueron colocadas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.

El ADN fue extraído empleando el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente (Fig 1), las células fueron lisadas usando detergentes y mediante el tratamiento de proteinasa

K seguida de la unión del ADN a columnas con una membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas. Los contaminantes celulares fueron eliminados mediante diferentes pasos de lavado. El ADN fue eluído de la membrana de la columna usando buffer TE (Tris-EDTA pH 8.0) y se mantuvo a 4°C durante un periodo no mayor a dos semanas.

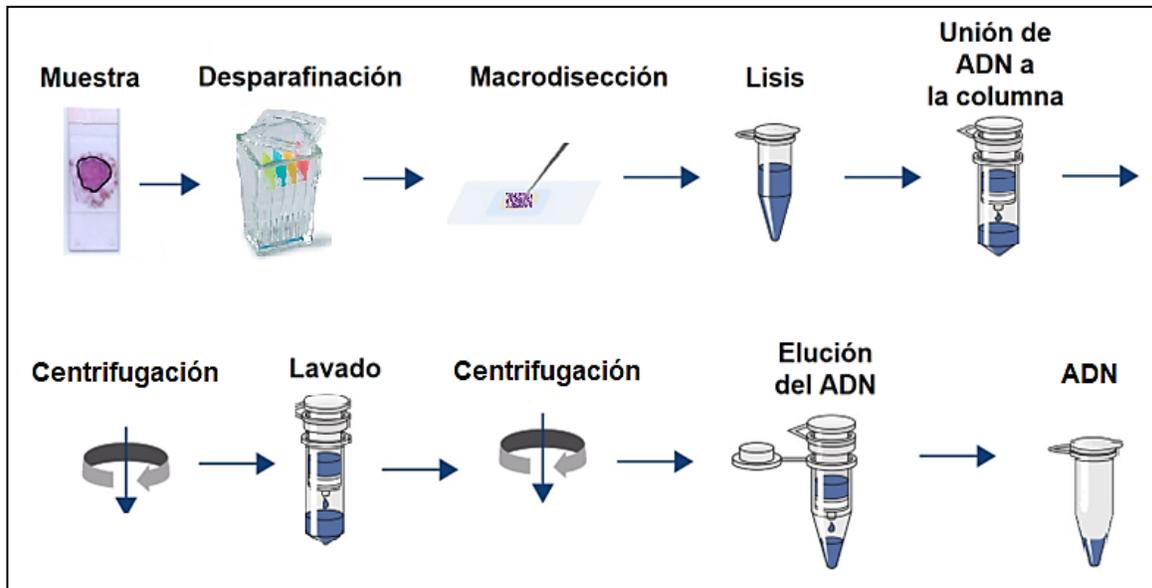


Fig. 1 Extracción de ADN.

La concentración de ADN de cada muestra se determinó por espectrofotometría (Nanodrop-Termofisher®). En el caso de ADN una unidad densidad óptica fue equivalente a 50 ng/ml. La pureza fue evaluada de acuerdo con las razones 260/280 y 260/230. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de contaminantes como proteínas, carbohidratos o resina de las columnas de purificación entre otros.

Detección del ADN de MCPyV mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se realizó la búsqueda de dos fragmentos de ADN correspondientes a dos proteínas víricas, el antígeno T largo (LT) y la proteína de la proteína de la cápside1 (VP1). El gen LT se localiza entre las posiciones 861-3080pb y mientras

que el gen VP1 se localiza entre las posiciones 4427 a 3156pb tomando en cuenta la dirección reversa de su inicio de transcripción. (Fig 2)

En las figuras 3 y 4 se muestra una representación gráfica de la localización de los oligonucleótidos empleados para la PCR así como de las secuencias amplificadas para cada gen.

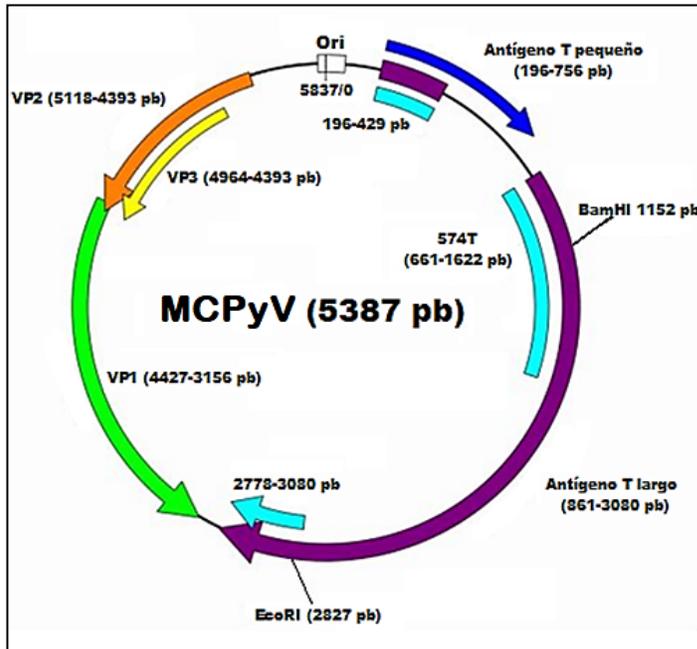


Fig. 2 Genoma del poliovirus de células de Merkel (MCPyV). Modificado de Feng et al 2008

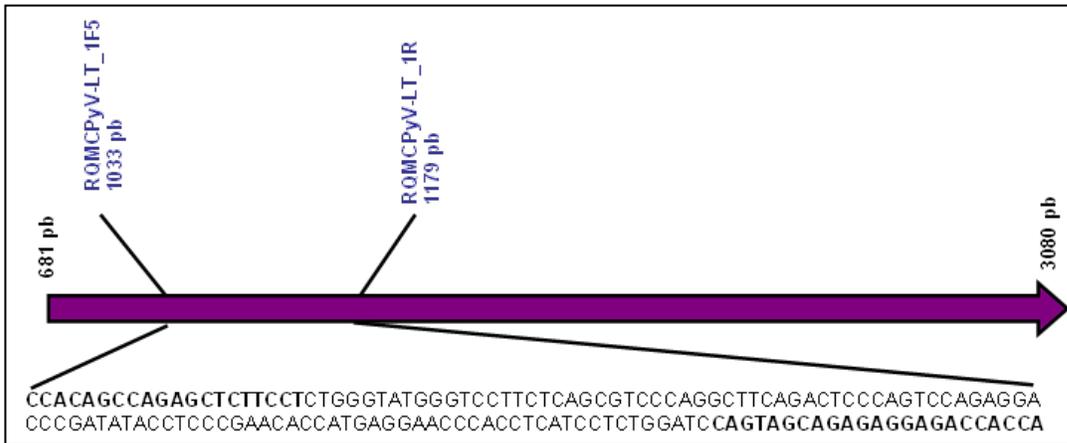


Fig. 3. Gen del antígeno T largo (LT)

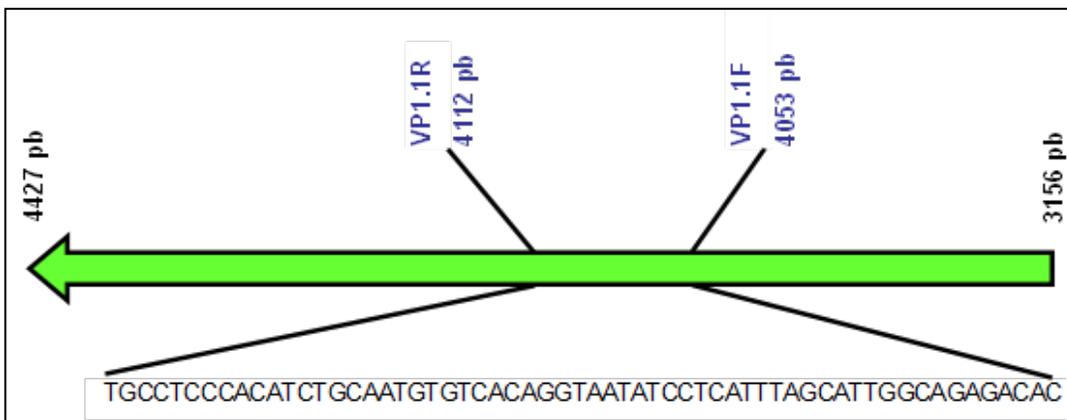


Fig. 4 Gen de la proteína de la cápside 1 (VP1)

Previo a la preparación de las mezclas de reacción las puntas, tubos y pipetas fueron expuestos a luz UV durante 15 minutos.

Amplificación del Gen del Antígeno T largo (LT): la reacción se realizó en un volumen de 15 ml. La reacción contenía 7.5 μ l de Master Mix PCR HotStart plus 2X (Qiagen, Hilden, Alemania), 0.12 μ l de cada oligonucleótido 10 μ M and 10, 2.5 μ l de ADN (~200 ng por reacción) y entre 100-150 ng de ADN. Los oligonucleótidos usados fueron: RQMCPyV_LT_1F 5'-CCACAGCCAGAGCTCTTCCT-3', RQMCPyV_LT_1R 5'-TGGTGGTCTCCTCTCTGCTACTG-3', (Rotondo et al., 2017a). Las condiciones de amplificación se ilustran en la figura 5.

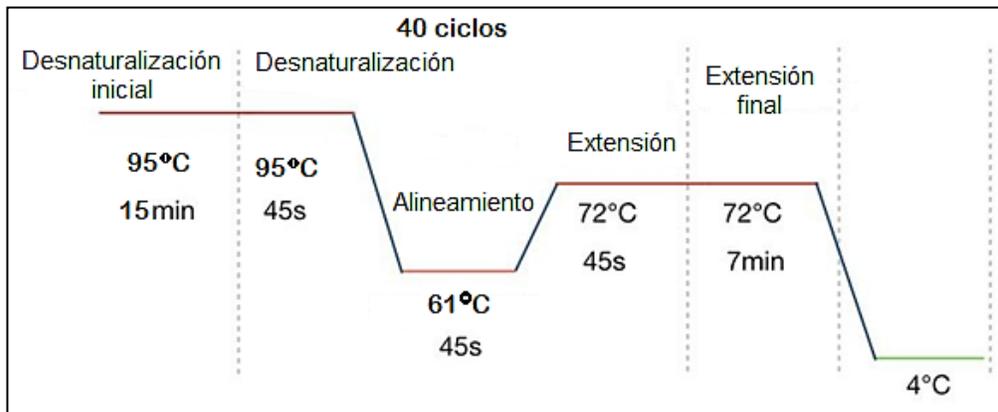


Fig. 5 Condiciones de amplificación del gen LT

El producto amplificado en las muestras positiva fue de 146 bp y fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con SybrGreen (Thermofisher, USA).

Amplificación del gen de la cápside (VP1): La reacción se realizó en un volumen total de 15 ml. La reacción contenía 7.5 μ l de Master Mix PCR HotStart plus 2X (Qiagen, Hilden, Alemania), 0.12 μ l de cada oligonucleótido 10 μ M and 10, 2.5 μ l de ADN (~200 ng por reacción) y entre 100-150 ng de ADN. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen VP1 fueron VP1.1F 5'-TGCCTCCCACATCTGCAAT-3' y VP1.1R 5'-GTGTCTCTGCCAATGCTAAATGA-3' dando como resultado un producto de 60 bp. Las condiciones de amplificación se visualizan en la figura 6.

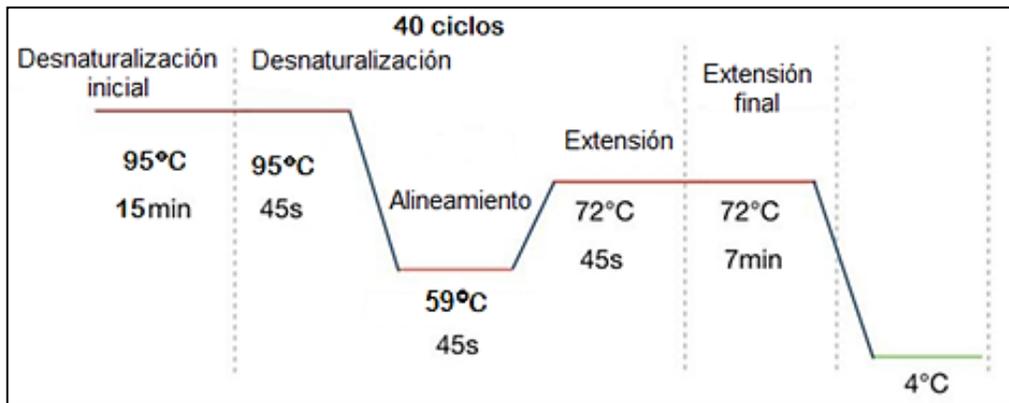


Fig. 6 Condiciones de amplificación del gen VP1

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con SybrGreen (Thermofisher, USA).

En las muestras negativas se evaluó la calidad del ADN mediante la amplificación del gen de la β -globina de acuerdo con las condiciones reportadas por Pancaldi et al., 2011, empleando los oligonucleótidos Betaglobine-S 5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3' y Betaglobine-A 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'.

7.6. MÉTODO, EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE SECUENCIACIÓN TIPO SANGER

Secuenciación de ADN

Los productos de la amplificación de LT y VP1 fueron purificados usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, USA). Los productos purificados fueron empleados como ADN molde para la secuenciación directa usando el Kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystem, Foster City, CA). La reacción se realizó en un volumen total de 20 µl que contenía 3.5 µl de BigDye Terminator, 2.0 µl de Buffer de secuenciación 5X, 1 µl de primer 10 mM y 1.5 µl de agua y 12 µl de ADN molde. Las condiciones de amplificación se visualizan en la figura 7.

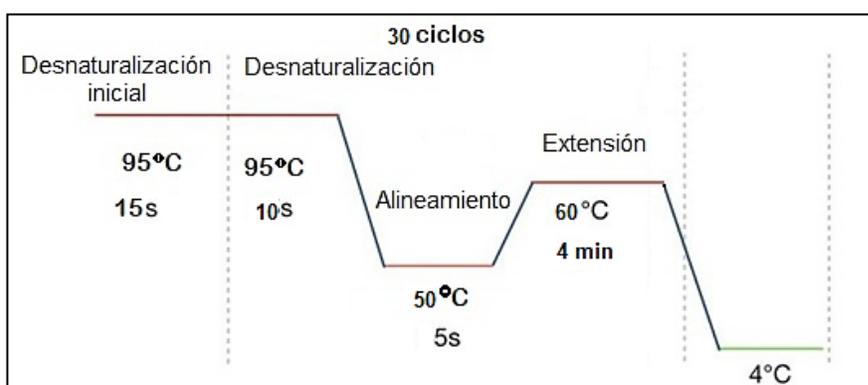


Fig. 7 Condiciones de la reacción de secuenciación.

Posterior a la reacción de secuenciación, los productos fueron purificados usando las columnas DyeEx™ 2.0 Spin (Qiagen, Hilden, Alemania), de acuerdo con las indicaciones del proveedor (Fig 8). Brevemente la columna de gel DyeEx 2.0 fue centrifugada a 3000 rpm durante 3 minutos dentro de un tubo colector, luego este se retiró y la columna fue colocada en un microtubo de 1.5 ml limpio. Se agregó la reacción de secuenciación sobre el gel y nuevamente se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min.



Fig. 8 Protocolo de purificación de reacciones de secuenciación con las columnas DyeEx-Qiagen.

El producto purificado se incubó 30 min a 60 C hasta su completa evaporación. Se agregaron 15 ml de formamida (Applied Biosystems, USA) y se incubó durante 10 min a 95 C. Los productos se separaron en el equipo de electroforesis capilar ABI 3100xl (Applied Biosystems, Foster City, CA). La identificación de las secuencias virales LT y VP1 se realizó mediante la comparación de los electroferogramas con la secuencia de referencia (Merkel cell polyomavirus isolate MCC350, complete genoma GenBank: EU375803.1 [90-94].

7.7 ASPECTOS ÉTICOS:

El presente estudio y los procedimientos empleados se apegan al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, así como con la declaración de Helsinki y sus enmiendas de acuerdo con los siguientes apartados:

-Procedimientos: Dado que es un estudio retrospectivo, no se realizaron maniobras ni intervenciones a los pacientes. Las muestras, se tomaron de los bloques de parafina, que se encuentran en el archivo de anatomía patológica, en su momento dichas biopsias fueron realizadas por los equipos quirúrgicos y para el abordaje de la enfermedad, previo consentimiento informado del paciente y/o responsable. Para el presente protocolo no se tomó ninguna muestra nueva ni se realizará maniobra alguna sobre los individuos en cuestión.

-Recopilación de información: de cada biopsia estudiada, se obtuvieron datos relevantes de los informes histopatológicos en el sistema electrónico, archivo clínico electrónico y físico. Se reevaluaron las laminillas correspondientes a cada caso, con la finalidad de verificar y reevaluar cada diagnóstico con variables adicionales a las obtenidas en los reportes histopatológicos. La información recabada de los expedientes clínicos fue manejada con estricta confidencialidad y únicamente para los fines estadísticos antes mencionados. Los investigadores del presente protocolo declaramos que no tenemos conflictos de interés alguno.

-Riesgo de la investigación: De acuerdo con la Ley General de Salud, es un estudio sin riesgo. A todos los pacientes se les solicitó la firma de consentimiento informado para toma de biopsia o procedimiento quirúrgico.

-Posibles beneficios:

Los resultados del proyecto permitirán un aporte al conocimiento de las características en la casuística de carcinoma de células de Merkel en México, en especial el estatus del poliomavirus y la presencia de marcadores de inmunohistoquímica aberrantes. Datos que son importantes para el diagnóstico diferencial y al menos teóricamente hacer una diferencia pronóstica.

Confidencialidad. Los investigadores nos comprometemos a resguardar y a mantener en anonimato los datos obtenidos de los sujetos de investigación. Los formatos de recolección de datos fueron identificadas con un folio numérico consecutivo que corresponde con los datos que puedan identificar al paciente en el estudio y solo los investigadores tienen acceso a los mismos.

-Conflictos de interés: No hay conflictos de interés por parte de ninguno de los miembros del equipo de investigación en este proyecto.

-Recursos, financiamiento y factibilidad: todos los estudios realizados, y gastos correspondientes, fueron cubiertos por el departamento de patología del INCMNSZ.

8. RESULTADOS

8.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS:

Las características clínicas de los pacientes incluidos en este estudio se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes estudiados	
n=17	
	n (%)
Sexo	
Masculino	8 (47)
Femenino	9 (53)
Edad de Diagnóstico	
Media (Rango)	67 (43-80)
Metástasis al diagnóstico	
Si	9 (35)
No	8 (65)
Sitio de Metástasis	
Pulmón	2 (12)
Ganglio	3 (18)
Retroperitoneo	3 (18)
Faringe	1 (6)
Inicio de tratamiento posterior al diagnóstico	
Meses (Rango)	10 (1-12)
Tratamiento inicial	
Cirugía	15 (88)
Radioterapia (neoadyuvancia)	2 (12)
Adyuvancia	
Carboplatino/etoposido	5 (29)
Carboplatino/etoposido/radioterapia	2 (12)
Carboplatino/etoposido/radioterapia/ Avelumab	1 (6)
Radioterapia	3 (18)
Sin adyuvancia	6 (35)
Recurrencia	
Masa pararectal	1 (6)
Ganglio	1 (6)
Glúteo Izquierdo	1 (6)
Ingle	1 (6)
Sin recurrencia	13 (76)

Se incluyeron 9 mujeres (53%) y 8 hombres (47%). La media de edad en la que se presentó este tumor es de 67 años con rango entre 43-80 años. Se identificó que la mayoría de los casos se localizaron en extremidades inferiores en el 48% de los casos (n=8) distribuidos en glúteo predominantemente en el 24% (n=4) y muslo-pierna en la misma proporción. En cabeza y cuello, así como en extremidad superior se encontraron en dos casos (Fig 9). Si tomásemos en cuenta la zona de exposición, clasificada por zona foto expuesta y no fotoexpuesta en los casos en los que se refirió la zona del tumor, el 29% los casos se encontrarían en una zona no fotoexpuesta (Fig.10). El tiempo para el inicio del tratamiento posterior al diagnóstico fue de diez meses. Las metástasis al diagnóstico se presentó en 6 pacientes (35%) ubicándose en ganglio, retroperitoneo, pulmón y faringe en orden descendente. Es importante mencionar que solo un paciente mostró metástasis en múltiples sitios. El tratamiento inicial recibido fue cirugía en el 88% de los casos (n=15) y radioterapia en el 12% de los casos (n=2). Cinco casos recibieron adyuvancia con carboplatino y etopósido (29%). En 2 casos la adyuvancia fue combinada con quimioterapia y radioterapia (12%), un caso combinado quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia (6%) y radioterapia sola en 3 casos (18%).

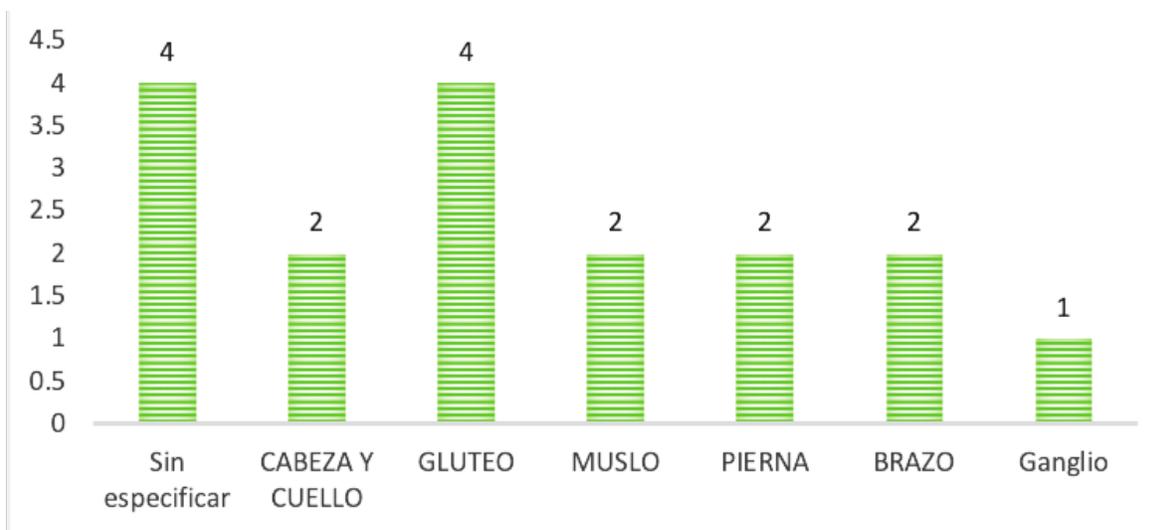


Fig.9 Localización del carcinoma de células de Merkel.



Fig.10 Distribución de muestras por zona de lesión, información disponible en archivo clínico.

8.2 MORFOLOGIA:

Para este estudio se obtuvieron un total de 26 casos en un periodo de 29 años entre 1991 y 2021. Se excluyeron siete casos por escaso material, 1 por material mal fijado y otro por no encontrarse en archivo por lo que finalmente se evaluaron 17 casos. Las características morfológicas de los tejidos analizados se muestran en la **Tabla 3. y Fig. 11**

**Tabla 3. Características morfológicas del carcinoma de células de Merkel
n=17**

Tipo de muestra	n= (%)
Piel	8 (47)
Tejidos blandos	7 (41)
Ganglio	2 (12)
Epidermotropismo	
Si	0 (0)
No	8 (47)
Sin epidermis	9 (53)
Tipo de lesión	
Úlcera	1 (6)
Hiperqueratosis	6 (35)
Elastosis solar	1 (6)
Necrosis	8 (47)
Patrón de crecimiento	
Difuso	13 (76)
Trabecular	1 (6)
Mixto	3 (18)
Tamaño celular	
Pequeño	7 (29)
Mediano	7 (29)
Grande	3 (18)
Volumen citoplasmático	
Poco citoplasma	13 (76)
Moderado citoplasma	3 (18)
Abundante citoplasma	1 (6)
Forma de núcleo	
Núcleo redondo	11 (65)
Núcleo elongado	0 (0)
Mixto	6 (35)
Nucleolo visible	
Si	0 (0)
No	17 (100)
Segunda Neoplasia	
Si	0 (0)
No	17 (100)
Formación de rosetas	
Si	0 (0)
No	17 (100)

El 47% de las muestras correspondió a piel (n=8) contando con la capa epidérmica, dermis superficie, profunda y tejidos blandos. Existen tres variables que solo se analizaron en estas muestras con epidermis en las cuales se favoreció la ausencia de epidermotropismo 47% (n=8), hiperqueratosis en el 35% de los casos (n=6) y úlcera en un solo caso 6% (n=1). El resto de las variables fueron analizadas en todas las muestras en las que se encontró elastosis solar en el 6% (n=1), patrón de

crecimiento predominante difuso en el 76% (n=13) y mixto en el 18% (n=3) con patrón de infiltración nodular en el 58% de los casos (n=10). Citológicamente destacan células grandes en el 18% (n=3), poco volumen citoplásmico en el 76 % correspondiendo a la mayoría de los casos (n= 13). La forma del núcleo más frecuente fue redonda en el 65% (n=11), existió combinación de morfología redonda y elongada en seis casos (35%) y en ninguna muestra se evidenció una segunda neoplasia adyacente, nucléolo ni formación de rosetas.

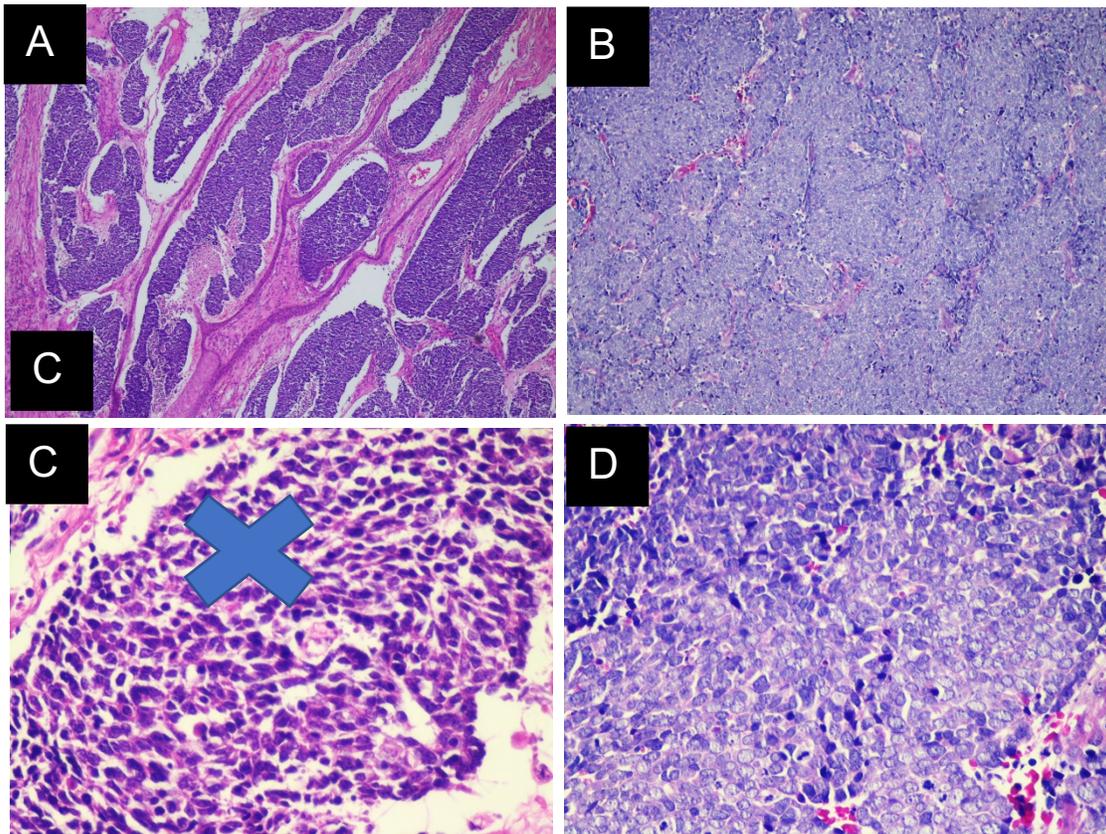


Fig.11 Características morfológicas: A. Patrón de crecimiento trabecular. B. Patrón de crecimiento difuso C. Núcleos elongados. D. Núcleos redondo

8.3 HISTOLOGÍA:

Considerando aquellas variables del reporte histopatológico estandarizado (Tabla 4), se observaron tumores con más de 5mm de profundidad y afección muscular en el 47% de los casos (n=8) y con clasificación Breslow y Clarck por encima de 5 en el 82% (n=14). Se observó infiltración perineural en el 24% de los casos (n=4), permeación linfovascular en el 41% (n=7), invasión ganglionar en el 52% (n=9) y márgenes positivos en el 29% (n=5).

Tabla 4. Reporte estandarizado de carcinoma de células de Merkel	
n=17	
	n (%)
Profundidad	
>5mm	8 (47)
<5mm	1 (6)
ND	8 (47)
Escala Breslow	
0-4	1 (6)
>5	14 (82)
Escala Clark	
0-4	1 (6)
<5	14 (82)
Afección Muscular	
Si	8 (47)
No	9 (53)
Infiltración perineural	
Si	4 (24)
No	13 (76)
Permeación linfovascular	
Si	7 (41)
No	10 (59)
Afección ganglionar	
Si	9 (53)
No	8(47)

Márgenes positivos

Si	5 (29)
No	12 (71)

8.4 ANALISIS DE CM2B4 Y PANEL AMPLIADO POR INMUNOHISTOQUIMICA:

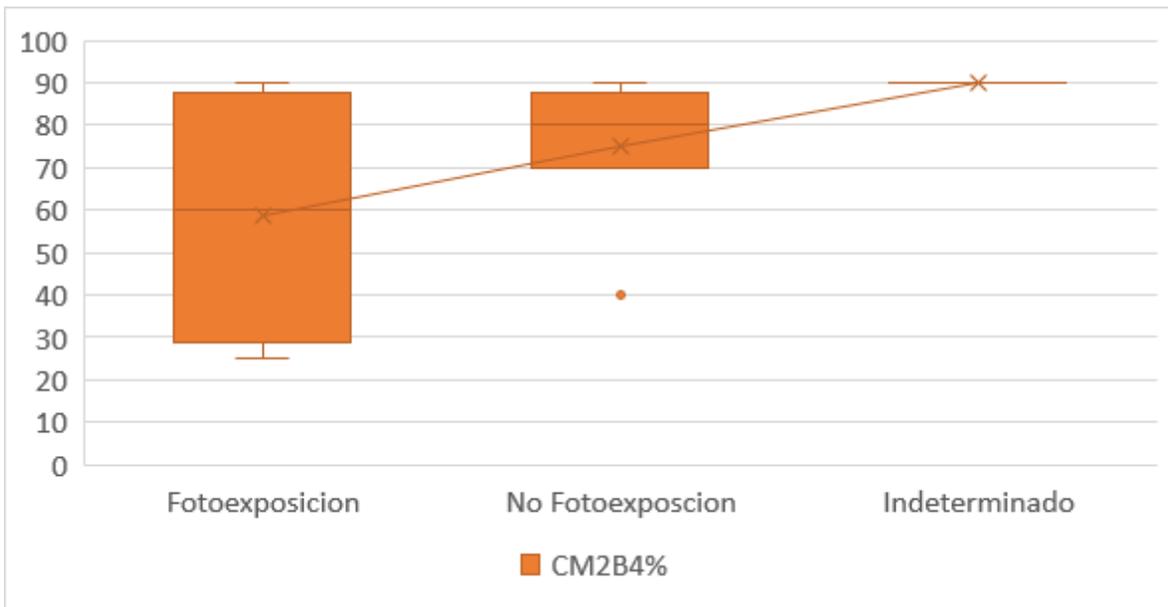
Existen algunas reacciones de inmunohistoquímica que no variaron respecto a su patrón de zona de tinción celular, entre ellos CM2B4 (núcleo), PAX 5(núcleo), CK20 (membrana), Cromogranina (citoplasma) y sinaptofisina (citoplasma) TTF-1 (nuclear) CD117 (Citoplasmico) P53 (Nuclear) TDT (citoplásmico). **Tabla 5**

**Tabla 5. Resultados de inmunohistoquímica en carcinoma de células de Merkel
n=17**

	n (%)		n (%)
CM2B4		TDT	
Positivo	13 (76)	Positivo	10 (76)
Negativo	1(6)	Negativo	7 (24)
ND	3 (17)		
PAX5		CD5	
Positivo	10 (59)	Positivo	0 (0)
Negativo	5 (29)	Negativo	17 (100)
ND	2 (12)		
CK20		EMA	
Positivo	17 (100)	Perinuclear	13 (76)
Negativo	0 (0)	Citoplásmico	1 (6)
CMGA		ND	3 (18)
Positivo	17 (100)	CK8/18	
Negativo	0 (0)	Perinuclear	8 (47)
SYPH		Citoplásmico	5 (29)
Positivo	17 (100)	Citoplásmico + perinuclear	1 (6)
Negativo	0 (0)	ND	3 (18)
TTF1		CD99	
Positivo	0 (0)	Perinuclear	13 (76)
Negativo	17 (100)	Citoplásmico	1 (6)
CD117		ND	3 (18)
Positivo	5 (29)	TP53	
Negativo	12 (71)	Positivo (Patrón mutado)	9 (53)
		Positivo (Patrón silvestre)	8 (47)

CM2B4: MCPyV large T-antigen; PAX5: Paired Box 5; CK20: Keratin 20; CHGA: Chromogranin A; SYPH: Synaptophysin; TTF1: Transcription Termination Factor 1; CD117: KIT Proto-Oncogene; TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase; CD5: T-Cell Surface Glycoprotein CD5; EMA: Mucin 1, Cell Surface Associated; CK8/18: Cytokeratin 8/18; CD99: T-Cell Surface Glycoprotein E2; TP53: Tumor Protein P53. ND: Indeterminado

El primero resultó positivo en el 76% de las muestras (n=13) de las tres muestras restantes uno se consideró negativo por tinción citoplásmica y los otros se consideraron como falsos positivos debido a la reacción positiva en bloque en la totalidad del tejido, granular, tenue en citoplasma y núcleo. En caso de considerar



la positividad nuclear por porcentaje de células tumorales reactivas, tiene un rango mas amplio en aquellas muestras de áreas fotoexpuestas. **Fig.12**

Fig. 12 Porcentaje de células con reacción positiva para anticuerpo CM2B4

Los casos sin fotoexposición o de sitio indeterminado demostraron reacción por encima del 70% de las células. Los marcadores de inmunohistoquímica con referencia hematolinfoide resultaron predominantes con PAX5 en 70% (n=12) y TDT con 76% (n=13), mientras que CD117 con 18% y CD5 negativo en todos los casos. Los anticuerpos con referencia epitelial resultaron positivos en el 82 % (n=14) para EMA con patrón paranuclear en el 93% de los casos. CK8/18 resulto positivo en el 82% (n=14) con patrón perinuclear predominante en el 57%. CD99

también demostró patrón perinuclear predominante en el 93% (n=13). Nueve casos (53%) demostraron reacción para P53 con patrón mutado en su forma homogénea en más del 80% de la neoplasia. Todos los casos fueron negativos para TTF1 y CD5. **Fig.13**

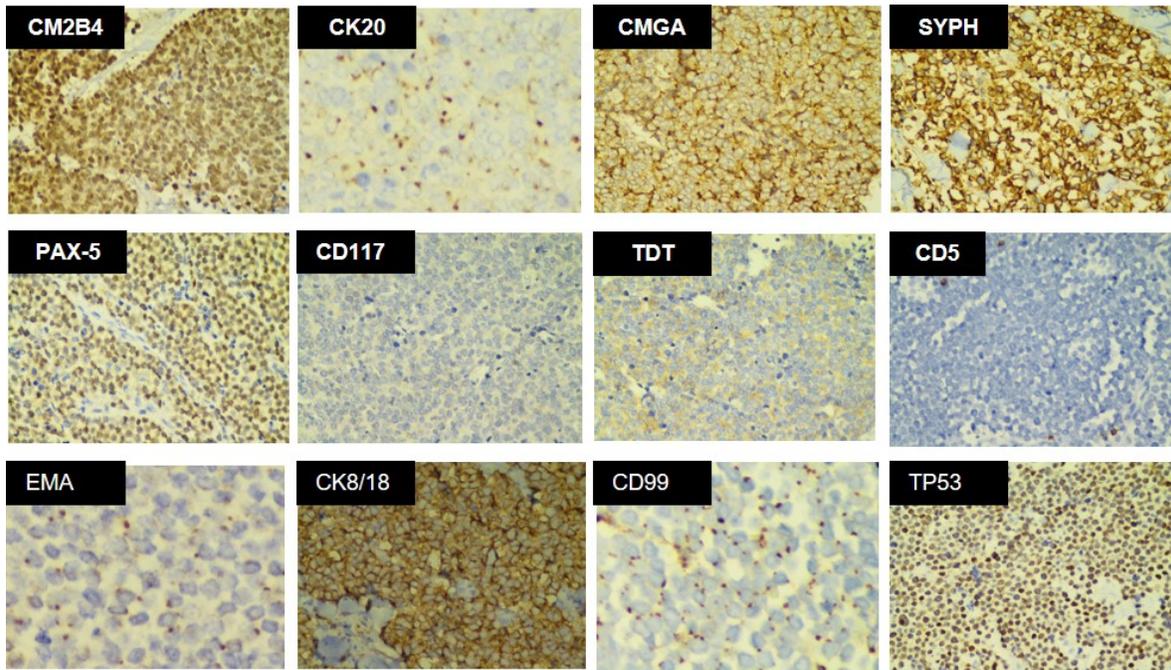


Fig.13 Patrones de tinción en reacciones de inmunohistoquímica. CM2B4 (CM2B4: MCPyV large T-antigen; PAX5: Paired Box 5; CK20: Keratin 20; CHGA: Chromogranin A; SYPH: Synaptophysin; TTF1: Transcription Termination Factor 1; CD117: KIT Proto-Oncogene; TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase; CD5: T-Cell Surface Glycoprotein CD5; EMA: Mucin 1, Cell Surface Associated; CK8/18: Cytokeratin 8/18; CD99: T-Cell Surface Glycoprotein E2; TP53: Tumor Protein P53.

8.5 DETECCIÓN DE LOS GENES LT Y VP1 DE MCPyV MEDIANTE PCR Y SECUENCIACIÓN TIPO SANGER

Para detectar la infección por poliomavirus en Células de Merkel se amplificaron dos fragmentos de los genes LT y VP1 de MCPyV mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los casos positivos para LT1 amplificaron un producto de 146 pb (**Fig 14A CCM-1,2, 4-7**) y de 60 pb para el fragmento de VP1 (Fig. 14 B CCM1-7). De los 17 casos evaluados para LT, 16 casos (94%) diagnosticados como Carcinoma de células de Merkel fueron positivos, mientras que 17 casos (100%) fueron positivos para la amplificación de la cápside1 VP1. Se analizaron

siete casos tomados como control negativo, tres de ellos fueron pieles sanas, dos muestras de mucosa bucal y dos muestras fueron de sangre periférica, del total dos resultaron positivos para LT (**Fig 15 y Fig 16**).

Para confirmar que los amplificadores detectados eran específicos para MCPyV se realizó la secuenciación de los casos positivos para LT y VP1 por el método de Sanger confirmándose que el producto de 146pb de la PCR correspondía al gen LT (**Fig 17 y Fig 18**). Se intentó secuenciar el producto amplificado de VP1 pero por ser un producto pequeño no fue posible.

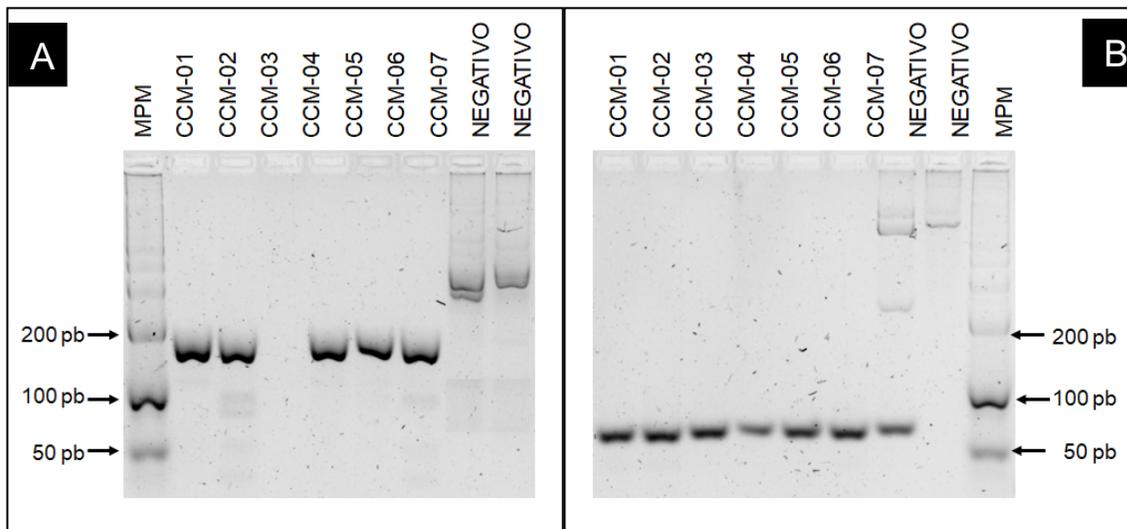


Fig.14 Electroforesis de los productos de amplificación del gen TL (A) y VP1 (B)

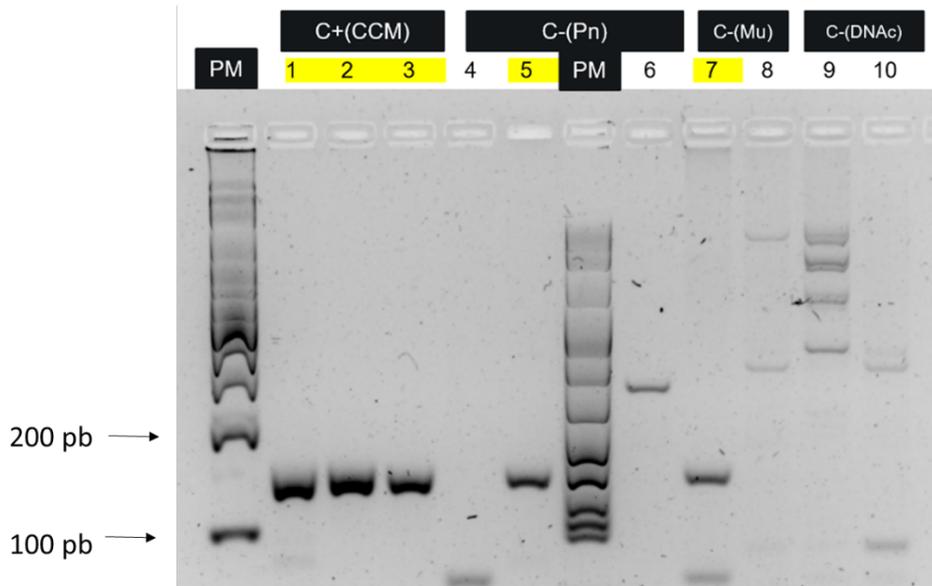


Fig.15 Electroforesis de amplificados LT en Carcinoma de células de Merkel (1- 5) y controles negativos (6-10). C+(CCM): Controles positivos, Carcinoma de células de Merkel C-(Pn): Control negativo, pieles C-(Mu): Control negativo, mucosas C-(DNAC): Control negativo, DNA comercial PM: Control de peso molecular.

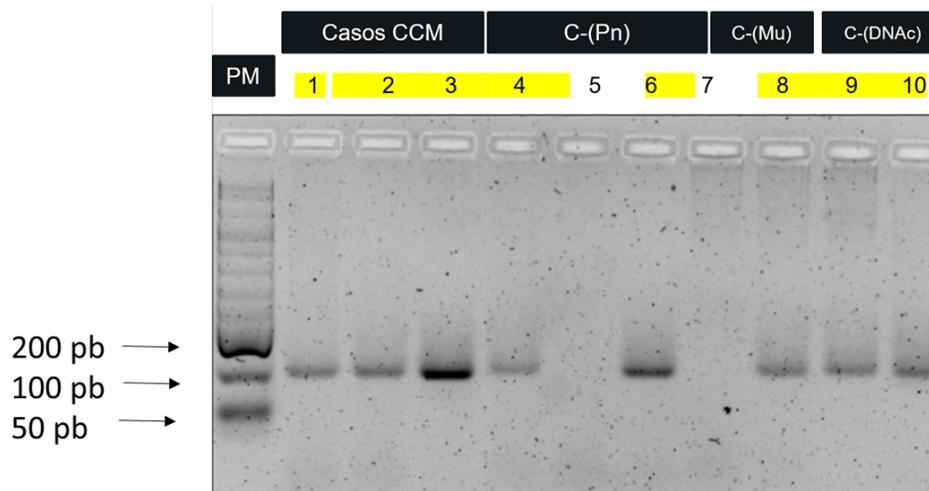


Fig. 16. Electroforesis de amplificados VP1 en Carcinoma de células de Merkel (1- 5) y controles negativos (6-10). C+(CCM): Controles positivos, Carcinoma de células de Merkel C-(Pn): Control negativo, pieles C-(Mu): Control negativo, mucosas C-(DNAC): Control negativo, DNA comercial PM: Control de peso molecular.

En las muestras negativas se evaluó la calidad del ADN mediante la amplificación del gen de la β -globina.

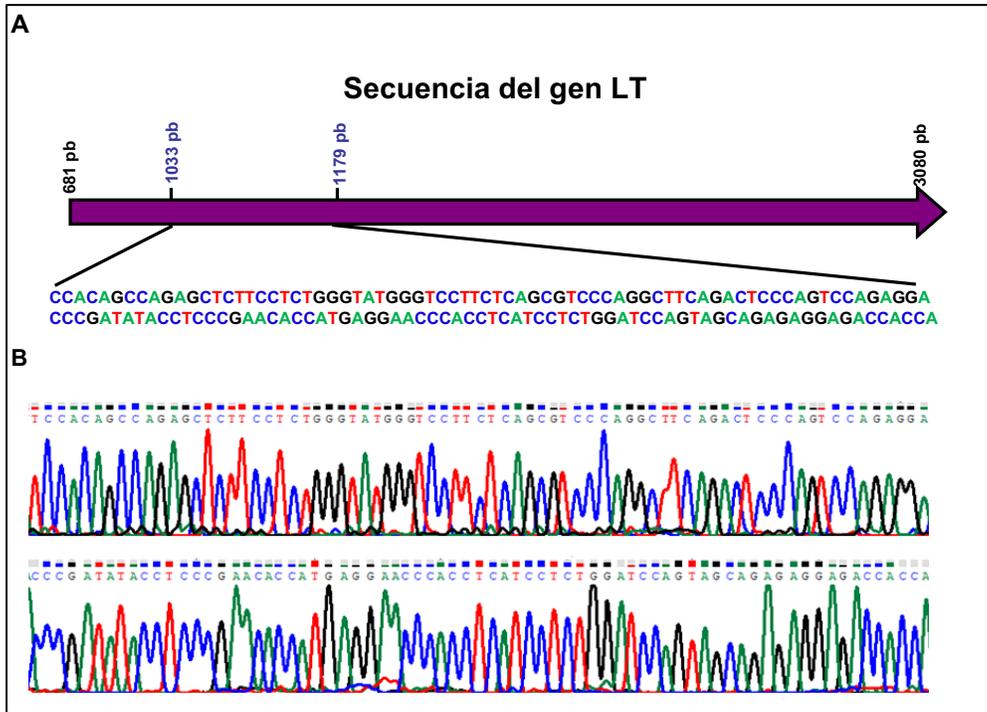
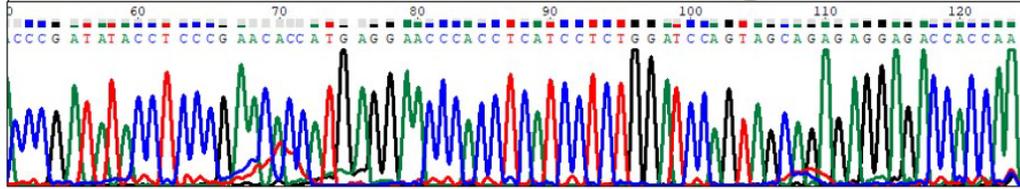


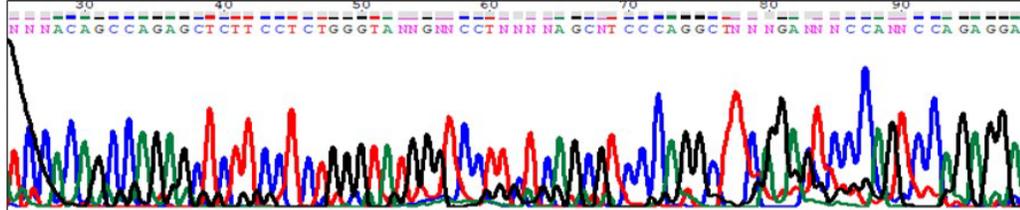
Fig 17. Secuenciación del gen LT. A: Localización del producto amplificado de LT mediante PCR. B: Secuenciación tipo Sanger de LT

Secuenciación Sanger

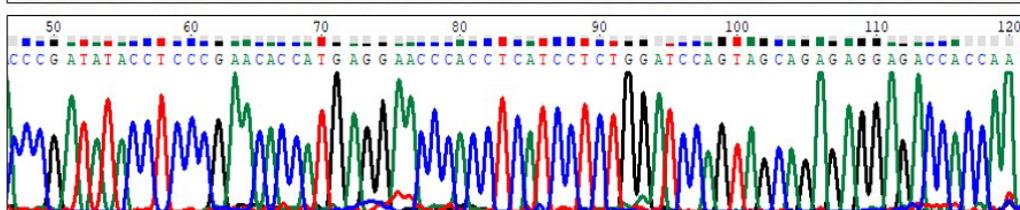
CCM1



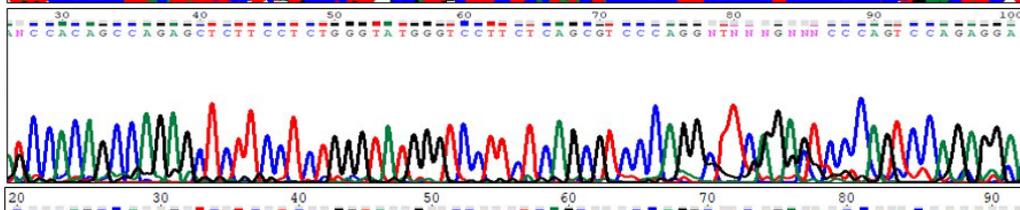
CCM2



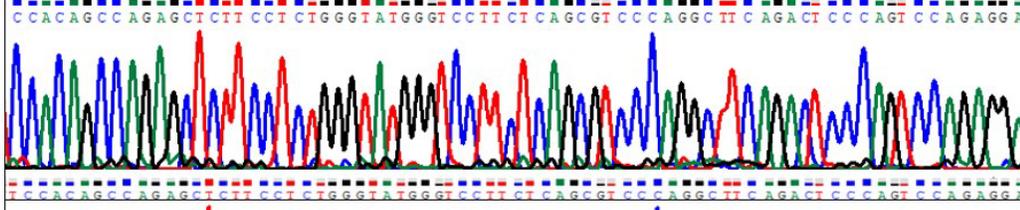
CCM3



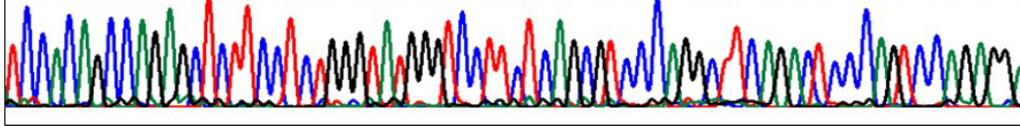
CCM4



CCM5

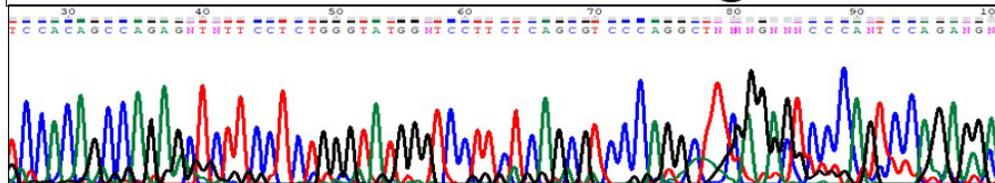


CCM6

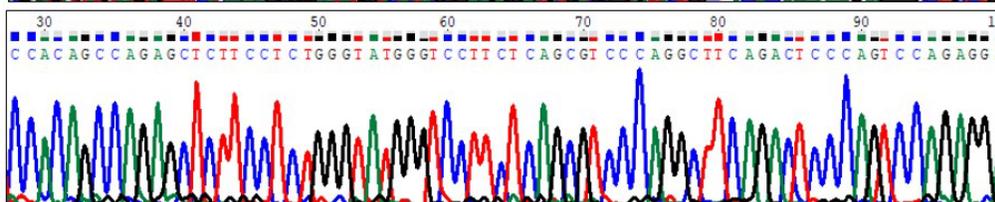


Secuenciación Sanger

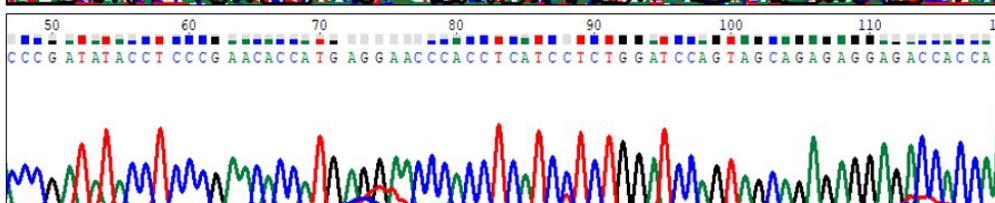
CCM7



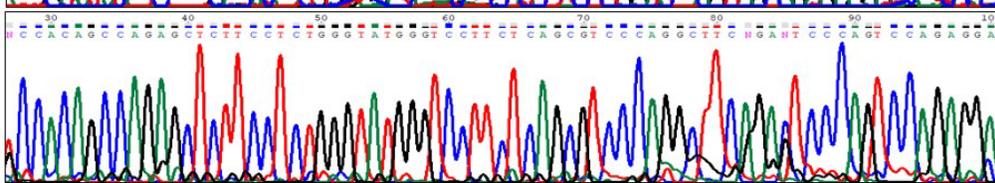
CCM8



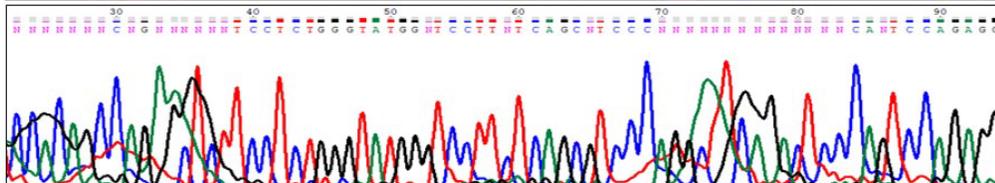
CCM9



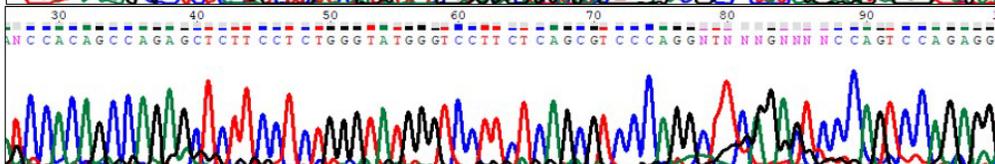
CCM10



CCM11



CCM12



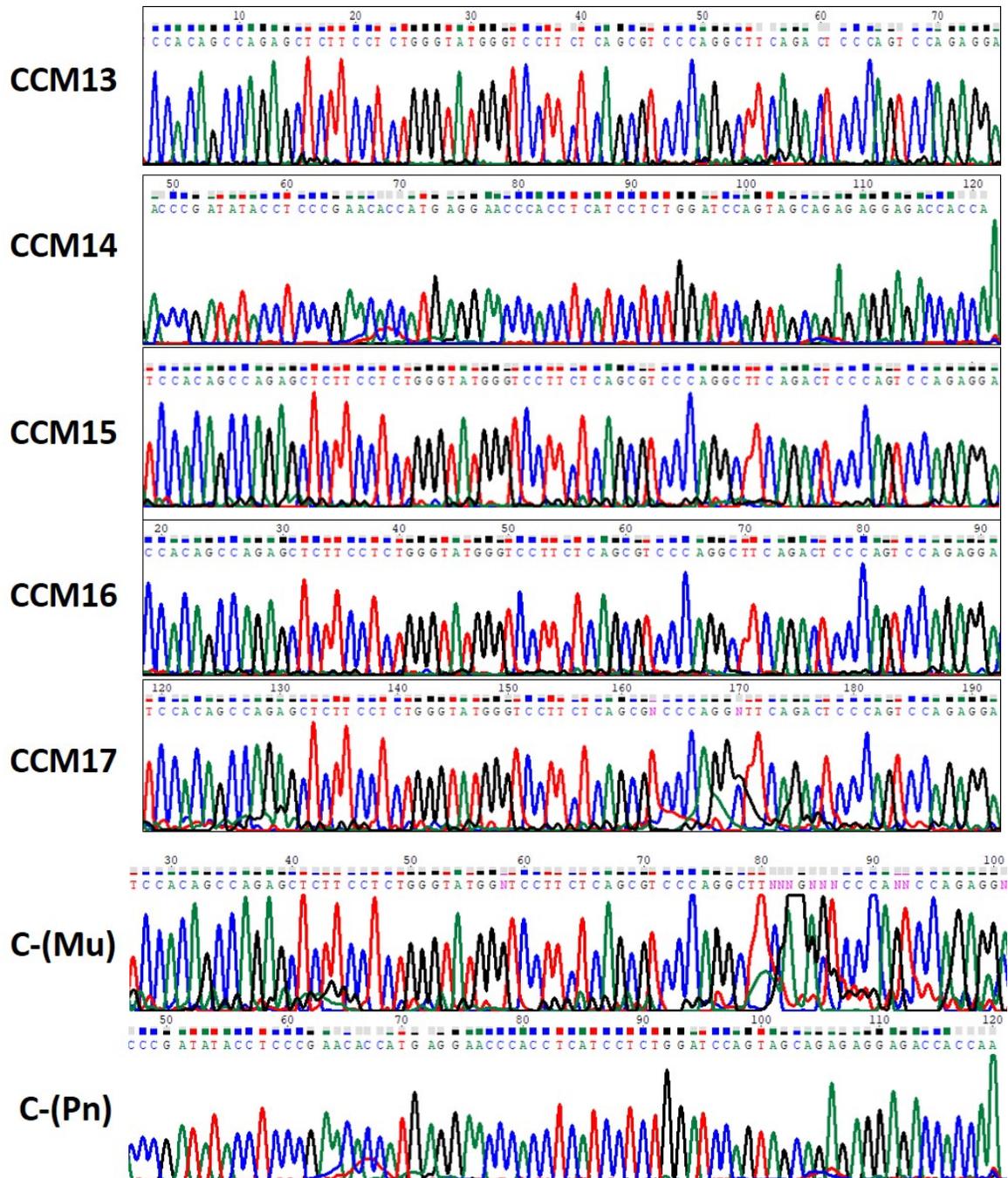


Fig. 18. Secuenciación tipo Sanger de los casos positivos para LT y VP1. CCM: carcinoma de células de Merkel. C-(Pn): Control negativo, pieles C-(Mu): Control negativo, mucosas

Se compararon los resultados obtenidos para la detección de MCPyV por inmunohistoquímica y PCR en los casos analizados, observándose una mayor sensibilidad al amplificar el fragmento LT (**Tabla 6**).

Tabla 6. Comparación de la detección de MCPyV en MCC por inmunohistoquímica y PCR

# Caso	CM2B4	PCR LT + secuenciación Sanger	PCR PV1	# Caso	CM2B4	PCR LT + secuenciación Sanger	PCR VP1
CCM1	+	+	+	CCM10	-	+	+
CCM 2	+	+	+	CCM11	+	+	+
CCM3	ND	+	+	CCM12	+	+	+
CCM4	+	+	+	CCM13	+	+	+
CCM5	+	+	+	CCM14	+	+	+
CCM6	ND	+	+	CCM15	+	+	+
CCM7	+	+	+	CCM16	+	+	-
CCM8	+	+	+	CCM17	+	+	+
CCM9	ND	+	-				

9.DISCUSION

En los 17 casos analizados las variables morfológicas que pueden asociarse al estatus del virus no demostraron mucha variación en cuanto al volumen de citoplasma y forma nuclear siendo la mayoría consistentes con estatus viral positivo. Y aunque el tamaño celular se distribuyó sin diferencias notables, el gran tamaño celular se demostró en tan solo 3 casos (18%) lo cual es consistente con los resultados para la identificación del virus, tal como la positividad y patrón de marcación de CD99, CK 20, EMA y CK8/18.[44] La evaluación de algunas características morfológicas como el epidermotropismo, ulceración, hiperqueratosis y elastosis solar se encuentran limitadas pues tan solo el 47% de nuestras muestras contaban con la capa epidérmica evaluable (n=8). Si consideramos esta como muestra total, la realidad es que no tenemos un resultado opuesto a lo que ya se ha reportado en dos estudios sobre la

hiperqueratosis/ulceración; sin embargo, debe tomarse en cuenta que en estos trabajos la presencia de estas dos características se asoció al estatus negativo del virus o a carcinomas de células de Merkel combinados con carcinoma epidermoide, lo cual es distinto a nuestros resultados. [48,95]

En nuestros casos predominó el panel de inmunohistoquímica clásico, aunque es de destacar que la mayoría resultaron positivos para el anticuerpo contra la proteína grande CM2B4 (76.4%), sin embargo, tres casos tuvieron interpretación dudosa y uno negativo, casos que finalmente fueron reclasificados como estatus positivo al virus gracias a dos métodos de biología molecular. Aunque la PCR PyV-LT resultó ser positiva en la mayoría (94%) llama la atención la negatividad en un caso de CCM con CM2B4 interpretada como positiva, así como su positividad en un caso control negativo de mucosa oral normal y piel sana. Esta información es relevante, ya que no es la primera vez que se hace informe de casos con reacción dudosa y que finalmente resultan positivos para el virus o viceversa [96-98]. También existen informes a donde la reacción se combina con patrón nuclear-citoplasmático, o citoplasma sin datos relevantes que sugieran que al menos sea un patrón de reacción positiva parcial, pues su presencia no tiene tendencias entre los grupos positivo o negativo al virus por PCR. [87] Hasta ahora entonces podemos entender que CM2B4 es un anticuerpo útil como un primer método de abordaje en la búsqueda de poliomavirus de células de Merkel, sin embargo, no podemos considerar su resultado del todo confiable, tan así que hay series que ya recomiendan usar este en combinación de PCR con varios cebadores para aumentar la probabilidad de su identificación. [99]

Este mismo fenómeno se observa con PCR PV1 que, aunque también resulta positiva en la mayoría de los casos (88%) también se encuentra de manera constante en controles negativos de piel sana y mucosa oral (71%).

El hecho de que PV1 resulte positivo en la mayoría puede deberse a que esta proteína es un fragmento común en varias especies de poliomavirus.[101] Además, se sabe que al igual de poliomavirus de células de Merkel se han encontrado con alta prevalencia en piel y mucosas normales otro tipo de

poliomavirus, por lo tal vez el hecho de encontrarlo no signifique que realmente tenga un papel oncogenico, a menos que demostremos la integración en cada caso que llegue a la rutina, lo cual es poco práctico. Si tomamos en cuenta que existe información sobre la alta prevalencia de poliomavirus en mucosas y piel normal, al grado de considerarse parte del viroma resulta hasta innecesaria la identificación cualitativa mientras que la cuantitativa representa una posible vía de investigación para la identificación de rangos constantes que se relacionen con el desarrollo posterior de carcinomas y por lo tanto que se pueda predecir su oncogenicidad, aunque la información que se tiene hasta la fecha hace notar la cantidad tan variable de rangos en los que podemos encontrar el virus.[102-103]

Respecto al panel de inmunohistoquímica ampliado llama la atención la presencia de marcadores de utilidad en hematopatología como pax5, TDT y cd117, los cuales fueron reactivos en más del 50% de los casos. Esto concuerda con las series donde se han explorado marcadores de inmunohistoquímica para diferenciación pre B y en general de histogénesis, sin embargo, no existe alguna tendencia con respecto a la zona anatómica. La importancia de esta información radica en los posibles diagnósticos erróneos ante casos comorbidos con neoplasias hematológicas, especialmente cuando la morfología del carcinoma es de tipo células pequeñas. [85,100]

La expresión de p53 se demuestra con patrón mutado en todas las muestras lo cual no concuerda con estatus viral por morfología, inmunohistoquímica y métodos de biología molecular, pues este patrón de reacción se ha asociado a oncogénesis por vía UV y estatus negativo para poliomavirus. Esto puede demostrar dos vías coexistiendo en un mismo fenómeno sin embargo para este constructo consideramos como propuesta para el futuro ampliar el estudio buscando alteraciones genéticas dirigidas hacia P53 y así verificar si es posible distinguir por este método tal como han sido dadas las bases de su oncogénesis.

10. CONCLUSIONES

La morfología es evaluable, sin embargo, se necesita una mayor cantidad de casos en subgrupos con y sin foto exposición para seguir evaluando su utilidad.

Considerando los estados comorbidos más comunes, es importante reconocer que esta neoplasia puede tener marcadores aberrantes que en contextos especiales puede condicionar a error o diagnóstico tardío.

El panel de inmunohistoquímica por conjunto no es más necesario ni más útil que los marcadores clásicos conocidos, pero hay que reconocer su patrón de reacción y positividad pues algunos de esos marcadores son de uso constante y suelen ser los primeros en realizarse (CK).

El anticuerpo CM2B4 aún se encuentra en exploración para conocer sus alcances, por lo que por sí solo y a pesar de sus buenos resultados existen casos en los que la tinción es dudosa de interpretar y al no estar estandarizada, es mandatoria la identificación del virus por otros métodos.

La amplificación del gen VP1 es una fracción común de los poliomavirus y estos también se ha identificado en tejidos sanos, por lo que no sería recomendable utilizarse la búsqueda individual si el objetivo es demostrar la presencia de un tipo específico de poliomavirus de células de Merkel.

Bibliografia

1. Xavier-Junior JCC, Ocanha-Xavier JP. WHO (2018) Classification of skin tumors. *Am J Dermatol* 2019;41:699-700.
2. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol* 1972;105:107-110.
3. Rywlin AM. Malignant Merkel-cell tumor is a more accurate description than trabecular carcinoma. *Am J Dermatopathol* 1982;4:513-515.
4. Walsh NM, Cerroni L. Merkel cell carcinoma: A review. *J Cutan Pathol* 2021;48:411-421.
5. Zwijnenburg EM, Lubeek SFK, Werner JEM, Amir AL, Weijs WLJ, Takes RP, Pegge SAH, van Herpen CML, Adema GJ, Kaanders JHAM. Merkel cell carcinoma. *Cancers* 2021;12:1614.
6. Patel P, Hussain K. Merkel cel carcinoma. *Clin Exp Dermatol* 2020,1-6.
7. Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Peñas PF, Nghiem P. Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: The AEIOU features. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:375-381.
8. Decaprio JA. Molecular pathogenesis of Merkel cell carcinoma. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2021;16:69-91.
9. Schadendorf D, Lebbe C, zur Hausen A, Avril MF, Hariharan S, Bharmal M, Bercker JC. Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. *Eur J Cancer* 2017;71:53-69.
10. Orphanet: cutaneous neuroendocrine carcinoma. Available online: https://www.orphanet.com/consortium/cgi-bin/Disease_Search.
11. Key statistics for Merkel cell carcinoma.
12. Youlten DR, Soyer HP, Youl PH, Fritschi L, Baade PD. Incidence and survival for merkel cell carcinoma in Queensland, Australia, 1993-2010. *JAMA Dermatol*. 2014;150:864-872.
13. Robertson JP, Liang ES, Martin RCW. Epidemiology of Merkel cell carcinoma in New Zealand: A population-based study. *Br J Dermatol*. 2015;173:835-837.
14. Girschik J, Thorn K, Beer TW, Heenan PJ, Fritschi L. Merkel cell carcinoma in Western Australia: A population-based study of incidence and survival. *Br J Dermatol*. 2011;165:1051-1057.
15. Chun SM, Yun SJ, Lee SC, Won YH, Lee JB. Merkel cell polyomavirus is frequently detected in Korean patients with merkel cell carcinoma. *Am Dermatol*. 2013;25:203-207.
16. Son PI, Liang H, Wei WQ, Jiang YQ, Smith JS, Qiao YL. The clinical profile of Merkel cell carcinoma in mainland China. *Int J Dermatol*. 2012;51:1054-1059.
17. Becker JC, Stang A, Decaprio JA, Cerroni L, Lebbe C, Veness M, Nghiem P. Merkel cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2017;3. 17
18. Hodgson NC. Merkel cell carcinoma: changing incidence trends. *J Surg Oncol* 2005;89:1-4.

19. Lyhne D, Lock-Andersen J, Dahlstrom K, Drzewiecki KT, Balslev E, Muhic A, Krarup-Hansen A. Rising incidence of Merkel cell carcinoma. *J Plast Surg Hand Surg.* 2011;45:274-280.
20. Eisemann N, Waldmann A, Geller AC, Weinstock MA, Volkmer B, Greinert R, Breitbart EW, Katalinic A. Non-melanoma skin cancer incidence and impact of skin cancer screening on incidence. *J Investig Dermatol* 2014;134:43-50.
21. Reichgelt BA, Visser O. Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993-2007.
22. 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;37:20-27.
23. Agbai ON, Buster K, Sanchez M, Hernandez C, Kundu RV, Chiu M, Roberts WE, Draelos ZD, BhushanR, Taylor SC, et al. Skin cancer and photoprotection in people of color: a review and recommendations for physicians and the public. *J Am Acad Dermatol* 2014;70:748-762.
24. Kaae J, Hansen AV, Biggar RJ, Boyd HA, Moore PS, Wohlfahrt J, Melbye M. Merkel cell carcinoma: incidence, mortality, and risk of other cancers. *J Natl Cancer Insti.* 2010;102:793-801.
25. Van Der Zwan JM, Trama A, Otter R, Larrañaga N, Tavilla A, Marcis Gragera R, Dei Tos AP, Baudin E, Poston G, Links T, et al. Rare neuroendocrine tumours: results of the surveillance of rare cancers in Europe project. *Eur J cancer.* 2013;49:2565-2578.
26. Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, Johnson TM, Liegeois-Kwon NJ, Otley CC, Paulson KG, 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;63:751-761.
27. 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.
28. López Panqueva RDP, Suarez-Zamora DA, Barrera-Herrera LE, Rolón Cadena M. Merkel Cell Carcinoma and Diagnostic Experience in a Reference Hospital: A Case Series. *Case Rep Med.* 2020 Feb 19;2020:8391510. doi: 10.1155/2020/8391510. PMID: 32148513; PMCID: PMC7049825.
29. K. Cogshall, T. L. Tello, J. P. North, and S. S. Yu, "Merkel cell carcinoma: an update and review," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 78, no. 3, pp. 433–442, 2018
30. Marcela Saeb-Lima, Daniel Montante-Montes de Oca, Jorge Albores-Saavedra. Merkel cell carcinoma with eccrine differentiation: a clinicopathologic study of 7 cases. *Annals of Diagnostic Pathology* 12 (2008) 410–414

31. Quintana QM, Casarez-Price JC, Noh N, Candanedo-González F. Carcinoma de células de Merkel; case clínico y revisión de la literatura. *GAMO* 2012;11(2):122-126.
32. Moisés-Hernández JF, Reyes-Millán M, Hernández-Serrano E, Cariño-Cartagena DA. Merkel cell carcinoma of the ethmoid sinus. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2014 Sep-Oct;65(5):320-1. English, Spanish. doi: 10.1016/j.otorri.2013.05.003. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23938032.
33. Quiroz-Sandoval OA, Cuellar-Hubbe M, Lino-Silva LS, Salcedo-Hernández RA, López-Basave HN, Padilla-Rosciano AE, León-Takahashi AM, Herrera-Gómez Á. Primary retroperitoneal Merkel cell carcinoma: Case report and literature review. *Int J Surg Case Rep.* 2016;19:21-4. doi: 10.1016/j.ijscr.2015.12.003. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26708276; PMCID: PMC4756087.
34. Becker Jc Kauczok CS, Ugurel S, Eib S, Brocker EB, Houben R. Merkel cell carcinoma: Molecular pathogenesis, clinical features and therapy. *JDDG J Ger Soc Dermatology.* 2008;6:709-719.
35. Llombart B, Monteagudo C, López-Guerrero JA, Carda C, Jorda E, Sanmartín O, Almenar S, Molina I, Martín JM, LLombart-Bosh A. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of 20 cases of Merkel cell carcinoma in search of prognostic markers. *Histopathology.* 2005;46:622-634.
36. Sparks J, Sparks M, Malone JC. Cutaneous Merkel cell carcinoma: Multiple asynchronous primary lesions in a patient on immunosuppressive therapy. *J Cutan Pathol.* 2017;44:309-312.
37. Gupta SG, Wang LC, Peñas PF, Gellenthin M, Lee SJ, Nghiem P. Sentinel lymph node biopsy for evaluation and treatment of patients with Merkel cell carcinoma: The Dana-Farber experience and meta-analysis of the literature. *Arch Dermatol.* 2006;142:685-690.
38. Rizzo JM, Harms PW, Harms KL, Plaska A, Brenner C, Durham AB. Unknown primary Merkel cell carcinoma in the immunosuppressed patient: case series. *JAAD Case Reports.* 2021;8:19-22.
39. National Comprehensive Cancer Network NCCN clinical practice guidelines in oncology: Merkel cell carcinoma (version 1.2021). *NCCN.org* 2021;1:1-69.
40. Keohane SG, Proby CM, Newlands C, Motley RJ, Nasr I, Mohd Mustapa MF, Slater DN: The new 8th edition of TNM staging and its implications for skin cancer: a review by the British Association of Dermatologists and the Royal College of Pathologists, UK. *Br J Dermatol.* 2018;179:824-828.
41. Paulson KG, Park SY, Vandeven NA, Lachance K, Thomas H, Chapus AG, Harms KL, Thompson JA, Bhatia S, Stang A, et al. Merkel cell carcinoma: current US incidence and projected increases based on changing demographics. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78:457-463.e2.
42. Elena Dellambra, Maria Luigia Carbone, Francesca Ricci, Francesco Ricci, Francesca Romana Di Pietro, Gaia Moretta, Sofia Verkoskaia, Elisa Feudi, Cristina M. Failla, Damiano Abeni, Luca Fania. Merkel cell carcinoma. *Biomedicines.* 2021;9(7):718.

43. Martin B, Poblet E, Rios JJ, Kazakov D, Kutzner H, Brenn T, Calonje E. Merkel cell carcinoma with divergent differentiation: histopathological and immunohistochemical study of 15 cases with PCR analysis for Merkel cell polyomavirus. *Histopathology*. 2013 Apr;62(5):711-22. doi: 10.1111/his.12091. PMID: 23530585.
44. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, Berthon P, Le Corre Y, Hainaut-Wierzbicka E, Aubin F, Bens G, Tabareau-Delalande F, Beneton N, Fromont G, Arbion F, Leteurtre E, Herfs M, Touzé A, Samimi M, Guyétant S. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing Merkel cell polyomavirus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol*. 2019 Nov;32(11):1605-1616. doi: 10.1038/s41379-019-0288-7. Epub 2019 Jun 14. PMID: 31201352.
45. Shuda, M. et al. Merkel cell polyomavirus small T antigen induces cancer and embryonic Merkel cell proliferation in a transgenic mouse model. *PLoS ONE* 6,10 (2015).
46. Tilling T, Moll I. Which are the cells of origin in merkel cell carcinoma? *J Skin Cancer*. 2012;2012:680410. doi: 10.1155/2012/680410. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23304516; PMCID: PMC3530849.
47. Harold A, Amako Y, Hachisuka J, Bai Y, Li MY, Kubat L, Gravemeyer J, Franks J, Gibbs JR, Park HJ, Ezhkova E, Becker JC, Shuda M. Conversion of Sox2-dependent Merkel cell carcinoma to a differentiated neuron-like phenotype by T antigen inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 Oct 1;116(40):20104-20114. doi: 10.1073/pnas.1907154116. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31527246; PMCID: PMC6778204.
48. Nagase K, Kimura-Kaku H, Inoue T, Shinogi T, Narisawa Y. Usefulness of ulceration and hyperkeratosis as clinical predictors of Merkel cell polyomavirus-negative and combined Merkel cell carcinoma: A retrospective study. *J Dermatol*. 2019 Feb;46(2):103-109. doi: 10.1111/1346-8138.14743. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30565285.
49. 214. Byrd-Gloster AL, Khor A, Glass LF, et al. Differential expression of thyroid transcription factor 1 in small cell lung carcinoma and Merkel cell tumor. *Hum Pathol*. 2000;31(1):58-62.
50. 216. Vazmitel M, Michal M, Kazakov DV. Merkel cell carcinoma and Azzopardi phenomenon. *Am J Dermatopathol*. 2007;29(3):314-315.
51. 217. Leong AS, Phillips GE, Pieterse AS, et al. Criteria for the diagnosis of primary endocrine carcinoma of the skin (Merkel cell carcinoma). A histological, immunohistochemical and ultrastructural study of 13 cases. *Pathology*. 1986;18(4):393-399.
52. 218. Wick MR, Swanson PE. *Cutaneous Adnexal Tumors. A Guide to Pathologic Diagnosis*. Chicago: ASCP Press; 1991
53. Quaglino D, Di Leonardo G, Lalli G, et al. Association between chronic lymphocytic leukaemia and secondary tumours: unusual occurrence of a neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 1997;1:11-16.

54. Vlad R, Woodlock TJ. Merkel cell carcinoma after chronic lymphocytic leukemia; case report and literature review. *Am J Clin Oncol.* 2003;26:531-534.
55. Papalás JA, McKinney MS, Kulback E, Dave SS, Wang E. Merkel cell carcinoma with partial B-cell blastic immunophenotype: a potential mimic of cutaneous Richter. *Am J Dermatopathol* 2014;36(2):148-152.
56. Sidiropoulos M, Al-Aradati H, Ross C, Alowami S. TdT expression in Merkel cell carcinoma: potential diagnostic pitfall with blastic hematological malignancies and expanded immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 2007;1113-1120.
57. Bah I, Li S, Yin CC, Tang G, Xu J. Merkel cell carcinoma mimicking transformed chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Clin Case Rep* 2019;7:2256-2257.
58. Alkhouri S, Afify O, Alkhouri F, Boalbanat H, Patel P. Merkel cell carcinoma in the setting of chronic lymphocytic leukemia and diffuse large B cell lymphoma. *Cureus* 2021;13(8):e17204.
59. Skelton HG, Smith KJ, Hitchcock CL, McCarthy WF, Lupton GP, Graham JH. Merkel cell carcinoma: analysis of clinical, histologic, and immunohistologic features of 132 cases with relation to survival. *J Am Acad Dermatol.* 1997;37(5 Pt 1):734-739.
60. Smith FO, Yue B, Marzban SS, et al. Both tumor depth and diameter are predictive of sentinel lymph node status and survival in Merkel cell carcinoma. *Cancer.* 2015;121(18):3252-3260.
61. Andea AA, Coit DG, Amin B, Busam KJ. Merkel cell carcinoma: histologic features and prognosis. *Cancer.* 2008;113(9):2549-2558. 61
62. Mott RT, Smoller BR, Morgan MB. Merkel cell carcinoma: a clinicopathologic study with prognostic implications. *J Cutan Pathol.* 2004;31(3):217-223.
63. Lai JH, Fleming KE, Ly TY, et al. Pure versus combined Merkel cell carcinomas: immunohistochemical evaluation of cellular proteins (p53, bcl-2 and c-kit) reveals significant overexpression of p53 in combined tumors. *Hum Pathol.* 2015;46(9):1290-6.
64. Brewer JD, Shanafelt TD, Otley CC, et al. Chronic lymphocytic leukemia is associated with decreased survival of patients with malignant melanoma and Merkel cell carcinoma in a SEER population-based study. *J Clin Oncol.* 2012;30(8):843-849.
65. Allen PJ, Busam K, Hill AD, Stojadinovic A, Coit DG. Immunohistochemical analysis of sentinel lymph nodes from patients with Merkel cell carcinoma. *Cancer.* 2001;92(6):1650-1655
66. Alvarez AMA, Boeta AL, Candanedo GF, Torre TDM, Guel PJA, López IM, Lopez RO, Mercadillo PP, Quintana QM, Quiñones VR, Veja ME, Gomez MJE, Aldrete VJA, Camacho SB, Mondragon BO. Multidisciplinary meeting on Merkel cell carcinoma. *Dermatol Rev Mex* 2020;64(5):535-555.
67. Feng H, Shuda M, Chang Y, et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008;319:1096-1100.

68. Foulongne V, Kluger N, Dereure O, et al. Merkel cell polyomavirus and Merkel cell carcinoma, France, *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1491-1493.
69. Kassem A, Schopflin A, Diaz C, 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_5009-5013.
70. Becker JC, Houben R, Ugurel S, et al. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol*. 2009;129:248-250.
71. Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, et al. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumor. *J Invest Dermatol*. 2009;129:246-248.
72. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, et al. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101:938-945.
- 73.3. Becker, J. C. & Zur Hausen, A. Cells of origin in skin cancer. *J. Invest. Dermatol*. 134, 2491–2493 (2014).
- 74.5. Harms, P. W. et al. The biology and treatment of Merkel cell carcinoma: current understanding and research priorities. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 15, 763–776 (2018).
- 75.19. Moll, I., Zieger, W. & Schmelz, M. Proliferative Merkel cells were not detected in human skin. *Arch Dermatol Res* 288, 184–187 (1996).
- 76.20. Ostrowski, S. M., Wright, M. C., Bolock, A. M., Geng, X. & Maricich, S. M. Ectopic Atoh1 expression drives Merkel cell production in embryonic, postnatal and adult mouse epidermis. *Development* 142, 2533–2544 (2015).
- 77.21. Liu, W. et al. Identifying the target cells and mechanisms of merkel cell polyomavirus infection. *Cell Host Microbe* 19, 775–787 (2016).
78. Zur Hausen, A., Rennspiess, D., Winnepeninckx, V., Speel, E.J., Kurz, A.K., 2013. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res*. 73, 4982–4987.
79. Kolhe R, Reid MD, Lee JR, Cohen C, Ramalingam P. Immunohistochemical expression of PAX5 and TdT by Merkel cell carcinoma and pulmonary small cell carcinoma: a potential diagnostic pitfall but useful discriminatory marker. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(2):142-7. Epub 2013 Jan 15. PMID: 23329999; PMCID: PMC3544244.
80. Murakami I, Takata K, Matsushita M, Nonaka D, Iwasaki T, Kuwamoto S, Kato M, Mohri T, Nagata K, Kitamura Y, Yoshino T, Hayashi K. Immunoglobulin expressions are only associated with MCPyV-positive Merkel cell carcinomas but not with MCPyV-negative ones: comparison of prognosis. *Am J Surg Pathol*. 2014 Dec;38(12):1627-35. doi: 10.1097/PAS.0000000000000279. PMID: 25392922.
81. Buresh CJ, Oliai BR, Miller RT. Reactivity with TdT in Merkel cell carcinoma: a potential diagnostic pitfall. *Am J Clin Pathol*. 2008 Jun;129(6):894-8. doi: 10.1309/R494HQ9VRDJWDY30. PMID: 18480005.

82. Sur M, AlArdati H, Ross C, Alowami S. TdT expression in Merkel cell carcinoma: potential diagnostic pitfall with blastic hematological malignancies and expanded immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 2007 Nov;20(11):1113-20. doi: 10.1038/modpathol.3800936. Epub 2007 Sep 21. PMID: 17885674.
83. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LsauerW. Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer*. 2010 May 1;126(9):2240-6. doi: 10.1002/ijc.24676. PMID: 19551862; PMCID: PMC2908249. Mudigonda
84. Dong HY, Liu W, Cohen P, Mahle CE, Zhang W. B-cell specific activation protein encoded by the PAX-5 gene is commonly expressed in merkel cell carcinoma and small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2005 May;29(5):687-92. doi: 10.1097/01.pas.0000155162.33044.4f. PMID: 15832095.
85. Sauer CM, Hagg AM, Chteinberg E, Rennspiess D, Winnepenninckx V, Speel EJ, Becker JC, Kurz AK, Zur Hausen A. Reviewing the current evidence supporting early B-cells as the cellular origin of Merkel cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Aug;116:99-105. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.05.009. Epub 2017 Jun 3. PMID: 28693804.
86. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernandez-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.
87. 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.
88. Helena Faust, Joakin Dillner. Merkel Cell polyomavirus: Epidemiology and Clinical Features Of Related Cancer. In: *Viruses and Human Cancer Science+ Business Media, New York, 2014: 357-367*
89. Pelletier, D. J., Czczok, T. W., & Bellizzi, A. M. (2018). A monoclonal antibody against SV40 large T antigen (PAb416) does not label Merkel cell carcinoma. *Histopathology*, 73(1), 162–166. <https://doi.org/10.1111/his.13483>
90. Ahmed M.M., Cushman C.H., De Caprio J.A. Merkel Cell Polyomavirus: Oncogenesis in a Stable Genome. *Viruses*. 2021;14:58.
91. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008 Feb 22;319(5866):1096-100.
92. Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, Allander T. Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. *Emerg Infect Dis*. 2009 Mar;15(3):489-91.
93. Pancaldi C, Corazzari V, Maniero S, Mazzoni E, Comar M, Martini F, et al. Merkel cell polyomavirus DNA sequences in the buffy coats of healthy blood donors. *Blood* (2011) 117:7099–101.

94. Tagliapietra A, Rotondo JC, Bononi I, Mazzoni E, Magagnoli F, Gonzalez LO, Contini C, Vesce F, Tognon M, Martini F. Droplet-digital PCR assay to detect Merkel cell polyomavirus sequences in chorionic villi from spontaneous abortion affected females. *J Cell Physiol.* 2020 Mar;235(3):1888-1894.
95. Naseri, S., Steiniche, T., Georgsen, J. B., Thomsen, R., Ladekarl, M., Heje, M., Damsgaard, T. E., & Bønnelykke-Behrndtz, M. L. (2020). Tumor Ulceration, Reduced Infiltration of CD8-Lymphocytes, High Neutrophil-to-CD8-Lymphocyte Ratio and Absence of MC Virus are Negative Prognostic Markers for Patients with Merkel Cell Carcinoma. *Cancers*, 12(4), 888. <https://doi.org/10.3390/cancers12040888>
96. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras MT, Tolstov Y, Gjoerup O, Mansukhani MM, Swerdlow SH, Chaudhary PM, Kirkwood JM, Nalesnik MA, Kant JA, Weiss LM, Moore PS, Chang Y: Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer* 2009, 125:1243–1249.
97. Kuwamoto S, Higaki H, Kanai K, Iwasaki T, Sano H, Nagata K, Kato K, Kato M, Murakami I, Horie Y, Yamamoto O, Hayashi K: Association of merkel cell polyomavirus infection with morphologic differences in merkel cell carcinoma. *Hum Pathol* 2011, 42:632–640.
98. Iwasaki T, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Higaki-Mori H, Nakajima H, Sano S, Hayashi K: Usefulness of significant morphological characteristics in distinguishing between merkel cell polyomaviruspositive and -negative merkel cell carcinomas. *Hum Pathol* 2013, 44:1912–1917.
99. Leitz M, Stieler K, Grundhoff A, Moll I, Brandner JM, Fischer N: Merkel cell polyomavirus detection in Merkel cell cancer tumors in Northern Germany using PCR and protein expression. *J Med Virol* 2013. doi:10.1002/jmv.23808
100. Zur Hausen, A., Rennspiess, D., Winnepeninckx, V., Speel, E. J., & Kurz, A. K. (2013). Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer research*, 73(16), 4982–4987. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0616>
101. Hurdiss, D. L., Frank, M., Snowden, J. S., Macdonald, A., & Ranson, N. A. (2018). The Structure of an Infectious Human Polyomavirus and Its Interactions with Cellular Receptors. *Structure (London, England : 1993)*, 26(6), 839–847.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.03.019>
102. Loyo, M., Guerrero-Preston, R., Brait, M., Hoque, M. O., Chuang, A., Kim, M. S., Sharma, R., Liégeois, N. J., Koch, W. M., Califano, J. A.,

- Westra, W. H., & Sidransky, D. (2010). Quantitative detection of Merkel cell virus in human tissues and possible mode of transmission. *International journal of cancer*, 126(12), 2991–2996. <https://doi.org/10.1002/ijc.24737>
103. Matsushita, M., Kuwamoto, S., Iwasaki, T., Higaki-Mori, H., Yashima, S., Kato, M., Murakami, I., Horie, Y., Kitamura, Y., & Hayashi, K. (2013). Detection of Merkel cell polyomavirus in the human tissues from 41 Japanese autopsy cases using polymerase chain reaction. *Intervirology*, 56(1), 1–5. <https://doi.org/10.1159/000338620>