

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

LUIZ CARLOS TAKITA

**CARCINOMA BASOCELULAR:
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES EM SUBTIPOS
HISTOLÓGICOS DE BAIXO E ALTO RISCO DE RECORRÊNCIA**

CAMPO GRANDE
2020

LUIZ CARLOS TAKITA

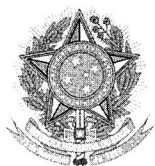
**CARCINOMA BASOCELULAR:
ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES EM SUBTIPOS
HISTOLÓGICOS DE BAIXO E ALTO RISCO DE RECORRÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Carcinogênese experimental e estudos do câncer na região Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos.

CAMPO GRANDE
2020



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos dezessete dias do mês de março do ano de dois mil e vinte, às treze horas e trinta minutos, no Anfiteatro II da FAMED, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Ricardo Dutra Aydos (UFMS), Eliane Barbosa Togoe (SEMS), Gunter Hans Filho (UFMS), Jorge Joao Chacha (UFMS) e Rondon Tosta Ramalho (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **LUIZ CARLOS TAKITA**, CPF 98615190844, Área de concentração em Tecnologia e Saúde, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Carcinoma Basocelular: análise da expressão de biomarcadores em subtipos histológicos de baixo e alto risco de recorrência**" e orientação de Ricardo Dutra Aydos. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Ricardo Dutra Aydos (Interno)
Dra. Eliane Barbosa Togoe (Externo)
Dr. Gunter Hans Filho (Interno)
Dr. Jorge Joao Chacha (Externo)
Dr. Peterson Vieira de Assis (Interno) (Suplente)
Dr. Rondon Tosta Ramalho (Interno)

ASSINATURA

AValiação

aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluno

DEDICATÓRIA

A Deus, pela minha existência.

Aos meus pais, **Yasuko e Hideo** (*in memoriam*), fontes de inspiração, sabedoria, equilíbrio.

A minha esposa Rita, minha melhor amiga, pelo amor, espírito de sacrifício durante esse período e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos**, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, pela amizade, incentivo e confiança depositados.

Ao **Prof. Dr. Günter Hans Filho**, Professor de Dermatologia da FAMED/UFMS e Chefe do Serviço de Dermatologia Dr. Günter Hans do HUMAP/UFMS, pelo valioso apoio desde os momentos iniciais deste projeto.

Ao **Dr. Marcel Arakaki Asato**, colega patologista, amigo e professor de Patologia da FAMED/UFMS, que gentilmente se dispôs a realizar conosco a leitura das lâminas histológicas dessa pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Rondon Tosta Ramalho**, do Laboratório de Carcinogênese Experimental da FAMED/UFMS, por ter nos apoiado com incentivo e sugestões em vários momentos desse projeto.

À **Profa. Dra. Iandara Schettert Silva**, pelo incentivo e apoio nas fases iniciais desse projeto.

Ao **Prof. Dr. Albert Schiavetto de Souza**, Professor e Diretor do INBIO da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela realização da análise estatística dessa pesquisa com grande competência e dedicação.

Ao **Prof. Dr. Guido Marks**, Professor da FAMED/UFMS e do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da UFMS, colega e amigo, pelo apoio e sugestões iniciais nas análises das amostras dessa pesquisa.

Ao **Dr. César Augusto Sobrinho**, colega médico e amigo, pela ajuda primorosa em imagens, figuras e na formatação dessa pesquisa.

Aos **Profs. Dr. Marcello Fabiano Franco** (*in memoriam*) e **Dra. Kunie Iabuki Rabello Coelho**, ambos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP-SP, a quem devo minha formação profissional.

À **Silvia Cordeiro das Neves**, doutoranda do Laboratório CeTroGen da FAMED/HUMAP da UFMS, pela ajuda inicial na análise estatística.

Aos funcionários do Setor de Histotécnica do Laboratório Screenlab, Srs. **Juarez Bezerra e Rodrigo Avelar**, pelo auxílio no processamento técnico da pesquisa.

À **Sra. Rosane Wakuta** do Laboratório Screenlab, pelo auxílio minucioso na parte textual da pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Jorge João Chacha**, ex-Reitor da UFMS e Professor de Dermatologia da FAMED/UFMS, que nos deu a honra de participar da banca examinadora.

À **Profa. Dra. Eliane Barbosa Togoe**, por ter aceito o convite de participar nas bancas de qualificação e defesa de tese.

A todos os alunos de graduação da FAMED e médicos residentes do Serviço de Dermatologia Dr. Günter Hans do HUMAP/UFMS, que nos apoiaram na obtenção de dados da pesquisa.

EPÍGRAFE

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos”

(Marcel Proust)

RESUMO

Takita, L. C. Carcinoma basocelular: Análise da expressão de biomarcadores em subtipos histológicos de baixo e alto risco de recorrência. Campo Grande, 2020. [Tese – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul]

Objetivo: Esse trabalho teve como objetivo principal analisar a expressão de biomarcadores inflamatórios (COX-2, CXCR4 e MMP-9), marcadores de CBC (Ber-EP4 e Bcl-2) e de proliferação celular (Ki-67) em subtipos histológicos de baixo e alto risco de recorrência do carcinoma basocelular (CBC).

Método: Os resultados desse estudo foram obtidos pela análise histológica e imuno-histoquímica de fragmentos de tecidos de pele disponibilizados pelo setor de dermatopatologia do Serviço de Dermatologia Dr. Günter Hans do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, município de Campo Grande, no período de fevereiro de 2015 a dezembro de 2018. Nessa pesquisa foram utilizadas 40 amostras teciduais (n=40) com diagnóstico histológico de carcinoma basocelular que foram divididas em dois subgrupos histológicos: Carcinoma basocelular nodular (n=25), considerado de baixo risco de recorrência, carcinoma basocelular esclerodermiforme (n=6) e carcinoma basocelular micronodular (n=9), esses dois últimos subtipos, considerados de alto risco de recorrência. Após a seleção desses dois subtipos histológicos as lâminas desses espécimes foram submetidas ao protocolo de marcação imuno-histoquímica com a utilização de cada um dos seis biomarcadores (COX-2, CXCR4, MMP-9, Ber-EP4, Bcl-2 e Ki-67). O padrão de intensidade de expressão de cada marcador dos diferentes subtipos foi realizado pela comparação entre pacientes com baixo e com alto risco de recorrência de carcinoma basocelular utilizando o teste de Mann-Whitney, uma vez que as amostras não passaram no teste de Shapiro-Wilk. Os demais resultados foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabela e gráfico.

Resultados: em relação aos marcadores CXCR4 e o Ki-67, ambos apresentaram intensidade de expressão maior nos carcinomas basocelulares de alto risco ($p=0,001$) e ($p<0,001$). Em relação à intensidade de expressão do marcador Bcl-2, nos carcinomas basocelulares de alto risco foi menor do que a observada nos CBCs de baixo risco ($p=0,038$). Não houve diferença estatística significativa entre os CBCs classificados como de baixo risco de recorrência e aqueles classificados como de alto risco, em relação a intensidade de expressão dos marcadores MMP-9 ($p=0,211$), COX-2 ($p=0,847$) e Ber-EP4 ($p=0,679$).

Conclusão: Dos seis marcadores analisados, identificou-se que em CXCR4 e Ki-67 a intensidade de expressão foi maior nos pacientes classificados como de alto risco ($p=0,001$ e $p<0,001$) respectivamente. A intensidade de expressão do marcador Bcl-2 nos pacientes de alto risco foi menor que nos pacientes de baixo risco ($p=0,038$). Os outros marcadores não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos subtipos analisados.

Palavras chaves: Carcinoma basocelular. Patologia. Biomarcadores. Inflamação.

ABSTRACT

Takita, L. C. Basal cell carcinoma: Analysis of the expression of biomarkers in histological subtypes of low and high risk of recurrence. Campo Grande, 2020. [Thesis - Postgraduate Program in Health and Development in the Midwest Region of the Federal University of Mato Grosso do Sul]

Objective: This study aimed to analyze the expression of inflammatory biomarkers (COX-2, CXCR4 and MMP-9), CBC (Ber-EP4 and Bcl-2) and cell proliferation (Ki-67) markers in histological subtypes low and high risk of recurrence of basal cell carcinoma (BCC).

Method: The results of this study were obtained by histological and immunohistochemical analysis of fragments of skin tissues made available by the dermatopathology section of the dermatology service Dr Günter Hans of Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - Federal University of Mato Grosso do Sul, of Campo Grande city, from february 2015 to december 2018. In this research, 40 tissue samples (n = 40) from patients with histological diagnoses of basal cell carcinoma were used, which were divided into two histological subtypes: nodular basal cell carcinoma (n = 25), considered low risk of recurrence, sclerodermiform basal cell carcinoma (n = 6) and micronodular basal cell carcinoma (n = 9), these last two subtypes, considered high risk of recurrence. After the selection of these two histological subtypes, the slides of these specimens were submitted to the immunohistochemical staining protocol using each of the six biomarkers (COX-2, CXCR4, MMP-9, Ber-EP4, Bcl-2 and Ki-67). The pattern of intensity of expression of each marker on the different subtypes was performed by comparing patients with low and high risk of recurrence of basal cell carcinoma using the Mann-Whitney test, since the samples did not pass the Shapiro-Wilk. The other results were presented in the form of descriptive statistics or in the form of a table and graph.

Results: In relation to CXCR4 and Ki-67, both showed higher intensity of marker expression in high-risk basal cell carcinoma ($p = 0.001$) and ($p < 0.001$). Regarding the intensity of expression of the Bcl-2 marker, in high-risk basal cell carcinoma it was lower than that observed in low-risk ($p = 0.038$). Regarding the intensity of expression of the markers MMP-9 ($p = 0.211$), COX-2 ($p = 0.847$) and Ber-EP4 ($p = 0.679$), there was no statistically significant difference between cases classified as having low risk recurrence and those classified as having high risk.

Conclusion: Of the six markers analyzed, it was identified that in CXCR4 and Ki-67 the intensity of expression was higher in patients classified as high risk ($p = 0,001$ and $p < 0,001$) respectively. The intensity of expression of the Bcl-2 marker in high-risk basal cell carcinoma was lower than in low-risk ($p = 0.038$). The other markers showed no statistically significant differences in the analyzed subtypes.

Key words: Basal cell carcinoma. Pathology. Biomarkers. Inflammation.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - por cento

40X - captura com objetiva de 40X ao microscópio óptico

AK – queratose actínica

AINES – anti-inflamatórios não-esteroidais

AP-1 – é um fator de transcrição que regula a expressão gênica em resposta a variados estímulos (citoquinas, fatores de crescimento, estresse e infecções bacterianas e virais)

Bcl-2 – é uma família de genes dos mamíferos e às proteínas a que esses genes dão origem. Regulam a permeabilidade da membrana externa das mitocôndrias e podem ser pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos

Ber-EP4 – *antibodies to epithelial antigen Ber-EP4*

BRAF – é um proto-oncogene humano que produz uma proteína

c-erbB – é um oncogene que determina a produção da proteína Her-2

c-MYC – é um gene que codifica uma proteína que atua na regulação do ciclo celular

CBC – carcinoma basocelular

CCL2 – *chemokine ligand 2*

CCL20 – *chemokine ligand 20*

CEA – antígeno carcinoembrionário

CEC – carcinoma espinocelular

CK15 – citoqueratina 15

CK20 – citoqueratina 20

COX-1 – ciclooxigenase 1

COX-2 – ciclooxigenase 2

CphA₂ – é uma beta-lactamase

CPNM – câncer de pele não melanoma

CREB – é um fator de transcrição celular

CSF1 – *colony stimulating factor 1*

CXCL1/GRO α – *C-X-C ligand1/melanoma growth stimulating activity*

CXCR4 – *C-X-C chemokine receptor type 4*

DNA – ácido desoxirribonucleico

EBP – é um gene que codifica uma proteína

EMA – *epithelial membrane antigen*

EMT – transição epitelial mesenquimal

GLI1 – *glioma-Associated Oncogene Homolog1*

H-RAS – é um produto proteico de um gene envolvido primariamente na regulação da divisão celular

HDM2 – é uma proteína associada ao zinco, reguladora negativa da via de sinalização p53

HHV – herpesvírus humano

HIF α – fator induzível por hipóxia 1-alfa

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HMG-box – *high mobility group box*

IFN- γ – Interferon gama

IKK – complexo enzimático proteico envolvido na propagação da inflamação

IKK α – IKK α - *I κ B kinase alpha signaling pathway*

IL-1 β – interleucina 1 β

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

INOS – *inducible nitric oxide synthase*

JAC/Src – é uma quinase da família Src

JNK – é uma proteína que ajuda a regular o processo de auto-destruição celular

LGR5 – *leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5*

MAPK – é uma subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina e regulam várias atividades celulares

MCF-7 – linhagem celular de câncer de mama

MEC – matriz extracelular

MMP-2 – *matrix metalloproteinase-2*

MMP-9 – *matrix metalloproteinase-9*

N-caderina – proteína transmembranar mediadora da adesão célula-célula

N-RAS – uma enzima codificada pelo gene NRAS

N – *National Comprehensive Cancer Network*

NF-kB – *factor nuclear kappa B*

P14/ARF – subtipo de proteína supressora tumoral

P16/INK^{4A} – subtipo de proteína supressora tumoral

P53 – conhecida como TP53, é um gene supressor tumoral que codifica uma fosfoproteína importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução de apoptose

p65 – proteína p65 (Oncogênica)

PCNA – *proliferating cell nuclear antigen*

PHLDA – *anti-PHLD gene antibody*

PTCH1 – *protein patched1* ou gene PTCH1

RA – receptor de androgênio

RNS - *reactive nitrogen species*

ROS – *reactive oxygen species*

SDF-1 α – *stromal cell-derived factor-1*

SENCAR – tipo de rato usado para experimentos de carcinogênese de vários tipos de neoplasia, principalmente neoplasias malignas de pele

SHH – *sonic hedgehog*

SNAIL – proteína participante no processo de carcinogênese

SOX9 – *transcription factor SOX-9*

SRY – *sex determining region Y*

STAT-3 – *signal transducer and activator of transcription 3*

SUFU – *suppressor of fused homolog*

TIMPs – *tissue inhibitors of metalloproteinases*

TLR7 – *toll-like receptor 7*

TNF α – fator de necrose tumoral alfa

TWIST – *Twist-related protein 1*

uPAR – receptor ativador de plasminogênio de uroquinase

UVA – radiação ultravioleta A

UVB – radiação ultravioleta B

VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

Vimentina – proteína da família dos filamentos intermediários, presente em células eucarióticas

WASL – *Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein*

α -SMA – *Alpha-smooth muscle actin*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Vias de sinalização Hedgehog (Gene PTCH1).....	19
Figura 2:	Quadro com os subtipos histológicos de CBC estratificados de acordo com o risco de recorrência.....	20
Figura 3:	CBC Nodular.....	21
Figura 4:	Histologia do CBC Nodular.....	22
Figura 5:	CBC Superficial.....	23
Figura 6:	Histologia do CBC Superficial.....	23
Figura 7:	CBC Pigmentado.....	24
Figura 8:	Histologia do CBC Pigmentado.....	25
Figura 9:	CBC Infundibulocístico.....	26
Figura 10:	Histologia do CBC Infundibulocístico.....	26
Figura 11:	Histologia do CBC Fibroepitelial (tumor de Pinkus).....	27
Figura 12:	Carcinoma Basoescamoso.....	28
Figura 13:	Histologia do Carcinoma Basoescamoso.....	28
Figura 14:	CBC Esclerodermiforme.....	29
Figura 15:	Histologia do Carcinoma Basocelular Esclerodermiforme.....	30
Figura 16:	CBC Infiltrativo.....	31
Figura 17:	Histologia do CBC Infiltrativo.....	31
Figura 18:	CBC Micronodular.....	33
Figura19a:	Histologia do CBC Micronodular	33
Figura19b:	Histologia do CBC Micronodular.....	33
Figura 20:	Vias de sinalização associadas com inflamação e câncer de pele.....	36
Figura 21:	Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 151396/16). MMP-9. Captura realizada com objetiva de 40X. (1+).....	51
Figura 22:	Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 151396/16). CXCR4. Captura realizada com objetiva de 40X. (3+).....	52
Figura 23:	Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 151396/16). Ki-67. Captura realizada com objetiva de 40X. (2+).....	52
Figura 24:	Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 177313/18). Bcl-2. Captura realizada com objetiva de 40X. (3+).....	53
Figura 25:	Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 172345/17). Ber-EP4. Captura realizada com objetiva de 40X.(3+).....	53
Figura 26:	Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 172918/17). COX-2. Captura realizada com objetiva de 40X. (2+).....	54
Figura 27:	Quadro mostrando a imunoexpressão em cruzes dos biomarcadores utilizados e correspondência com os subtipos histológicos de baixo e alto risco de recorrência.....	55
Figura 28:	Gráfico <i>box plot</i> apresentando a intensidade de expressão dos marcadores na imuno-histoquímica.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Resultados da intensidade de expressão dos marcadores na imuno-histoquímica (0 a 3 cruces), de acordo com o risco de recorrência de carcinoma basocelular (CBC).....	59
-----------	--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1.	Epidemiologia.....	17
2.2.	Patogênese Molecular.....	18
2.3.	Quadro Clínico.....	19
2.4.	Subtipos de Baixo Risco.....	20
2.4.1.	Carcinoma Basocelular Nodular.....	20
2.4.2.	Carcinoma Basocelular Superficial.....	22
2.4.3.	Carcinoma Basocelular Pigmentado.....	24
2.4.4.	Carcinoma Basocelular Infundibulocístico.....	25
2.4.5.	Carcinoma Basocelular Fibroepitelial (tumor de Pinkus).....	27
2.5.	Subtipos de Alto Risco Histológico.....	27
2.5.1.	Carcinoma Basoescamoso.....	27
2.5.2.	Carcinoma Basocelular Esclerodermiforme.....	29
2.5.3.	Carcinoma Basocelular Infiltrativo.....	30
2.5.4.	Carcinoma Basocelular com Diferenciação Sarcomatoide.....	32
2.5.5.	Carcinoma Basocelular Micronodular.....	32
2.6.	Evidências de inflamação na carcinogênese.....	34
2.7.	Evidências de inflamação na tumorigênese de CBCs.....	37
2.8.	Revisão dos biomarcadores utilizados na pesquisa.....	40
3.	OBJETIVOS.....	45
3.1.	Objetivo Geral.....	45
3.2.	Objetivos Específicos.....	45
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1.	Aspectos Éticos.....	46
4.1.1.	Critérios de inclusão.....	46
4.1.2.	Critérios de exclusão.....	46
4.2.	Técnica de Imuno-histoquímica.....	47
4.3.	Equipamentos utilizados na imuno-histoquímica.....	47
4.4.	Reação imuno-histoquímica – procedimentos.....	48
4.4.1.	Cortes histológicos.....	48
4.4.2.	Preparação.....	48
4.4.2.1.	Período noturno.....	48
4.4.2.2.	Período da manhã.....	48
4.4.2.3.	Incubação com anticorpo primário.....	49
5.	Resultados.....	51
5.1.	Análise da imunoexpressão dos seis marcadores pesquisados.....	51
5.2.	Análise estatística dos dados.....	58
5.3.	Discussão.....	61
5.4.	Perspectivas.....	68
6.	Conclusão.....	69
7.	Referências.....	70
8.	Anexos.....	82

INTRODUÇÃO

O carcinoma basocelular (CBC) é um tumor epitelial maligno de origem epidérmica, derivado das células que se originam da camada basal da epiderme. O tumor foi descrito inicialmente em 1824 por Jacob que denominou o tumor de pele hoje conhecido como carcinoma basocelular (*apud* NEVES, TALHARI, SOARES FILHO, 2001). É também denominado epitelioma basocelular. O carcinoma basocelular é a neoplasia maligna mais comum nos seres humanos, com baixa mortalidade, alta morbidade, apresentando como fator de risco mais importante a exposição à radiação solar (UVB e UVA). Os raios ultravioleta B geram fotoprodutos mutagênicos para o DNA e induz mutações em importantes genes reguladores das funções celulares, como o gene supressor tumoral TP53. Os raios ultravioleta A geram radicais livres citotóxicos e mutagênicos, potencializando os efeitos dos raios UVB (ELDER *et al.*, 2018).

Há evidências atuais que suportam o papel de biomarcadores inflamatórios relacionados com a tumorigênese do carcinoma basocelular (NEAGU *et al.*, 2019; KIM, KUS, RUIZ, 2019, MARU *et al.*, 2014).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

A terminologia câncer de pele não melanoma (CPNM) inclui o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma espinocelular (CEC), correspondendo a 25% de todos os tumores malignos registrados. Sua incidência é mais alta na Austrália, onde 1:2 residentes desenvolve CBC antes dos 70 anos. Nos EUA a incidência é de 576 casos/100.000 pessoas/ano. No Brasil foram estimados 85.170 casos novos de câncer de pele não melanoma (CPNM) nos homens e 80.410 nas mulheres em 2018. Correspondem a um risco estimado de 82,53 casos novos/100.000 homens e 75,84/100.000 mulheres (INCA, 2018).

A proporção homens/mulheres é de aproximadamente 1,5:1,0. Pessoas com fototipos claros (I e II de Fitzpatrick), história familiar positiva de CBC (30-60%), com sardas na infância, olhos e cabelos claros, são mais predispostas a desenvolver a neoplasia. Em pacientes com menos de 40 anos a incidência do tumor vem aumentando mais nas mulheres (KIM, KUS, RUIZ, 2019).

Em regiões de alta latitude a proporção de casos de CBC para cada caso de CEC é de 4:1. O CBC a nível global corresponde a 70-80% de todos os cânceres de pele. Nas populações de pele muito pigmentada é um tumor raro, especialmente em partes da África. O perfil epidemiológico da doença nas últimas décadas vem mostrando uma elevação da taxa de incidência do CBC, aumento maior nas faixas etárias entre a 4ª e 5ª década de vida (pacientes mais jovens), maior incidência do subtipo superficial e de tumores com subtipo histológico de maior risco de recorrência, maior número de CBCs em áreas cobertas do corpo e aumento maior de casos em pessoas de classe social mais elevada (KIM, KUS, RUIZ, 2019).

Outros fatores de risco externos para o desenvolvimento de CBC são: câmaras de bronzamento, exposição crônica ao arsênio, radiação ionizante, imunossupressão crônica, principalmente em transplantados de órgãos sólidos, e infecção pelo HIV (ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019).

Apesar de sua alta incidência, as taxas de metástase são de 0,0028% à 0,5%, e a mortalidade estimada é de 0,12 casos por 100.000 habitantes. Dados não publicados do Brigham and Women's Hospital, sugerem, contudo, que o risco de

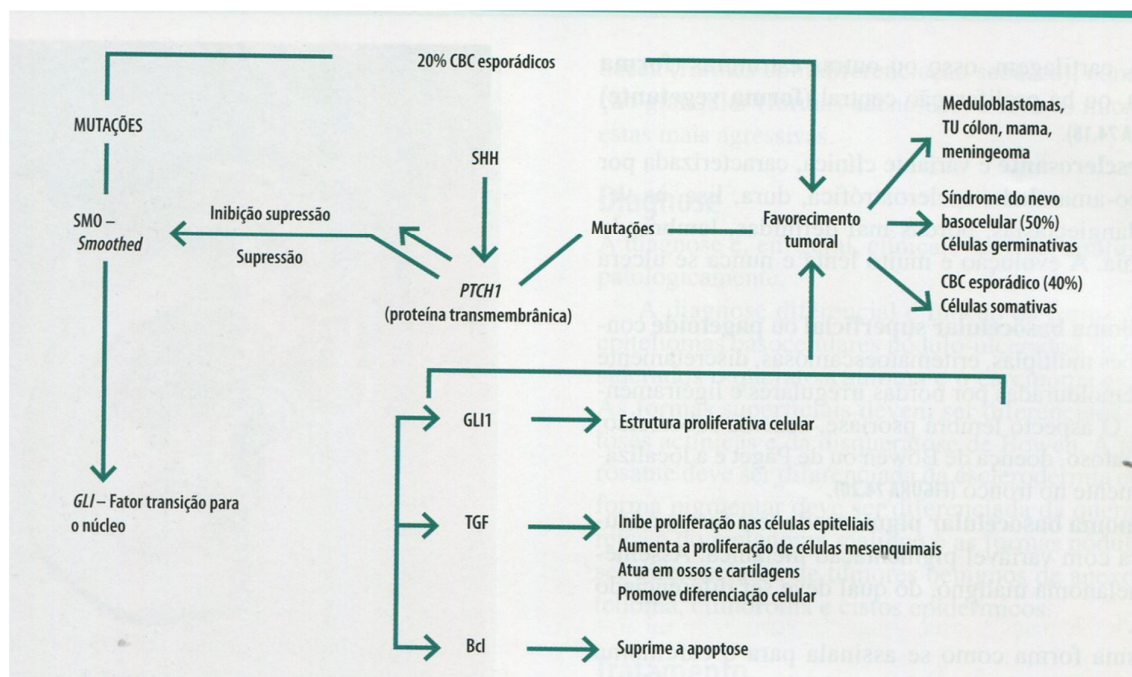
metástase e morte é de 6,5% em tumores maiores ou iguais a 2,0 cm (KIM, KUS, RUIZ, 2019).

2.2 Patogênese molecular

O CBC apresenta as maiores taxas de prevalência de mutações de todos os cânceres, determinadas pela exposição à radiação ultravioleta (UV). A via de sinalização intracelular *patched/hedgehog* (PTCH1) desempenha fundamental importância tanto em CBCs esporádicos como na síndrome de CBC nevóide (síndrome de Gorlin). Observam-se mutações no gene PTCH1 localizado no cromossomo 9q22.3 (58-69%) dos CBCs esporádicos, bem como em todos os pacientes com síndrome de CBC nevóide. A via SHH (*Sonic Hedgehog*) que compreende os genes IHH, DHH e SHH é muito importante para o desenvolvimento durante as fases iniciais do embrião (MONTAGNA, LOPES, 2017; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2016; MARZUKA, BOOK, 2015; TANG *et al.*, 2010; TILLEY, DEEP, AGARWAL, 2015, RIVITTI, 2018, CARDOSO, 2010), conforme figura 1.

Na pele, a via SHH atua no suporte da população de células-tronco e auxilia no desenvolvimento dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas. Esta via é implicada no ciclo celular, particularmente nas transições G1-S e G2-M, e nos adultos esta via está inoperante, e sua ativação se correlaciona com o surgimento do CBC e outros tumores. A proteína *patched 1* (PTCH1) inibe a proteína *smoothed* (SMO). O ligante SHH, em contato com PTCH1, forma o complexo PTCH1-SHH que então libera a SMO, um transdutor de sinal que se internaliza e libera a inibição da proteína supressora of fused homolog (SUFU) sobre as proteínas *glioma-associated oncogene-1* (GLI₁). Também há mutações do gene TP53 no cromossomo 17p13.1 (44-65%) dos CBCs. Outras anormalidades genéticas que predis põem ao aparecimento de CBCs incluem albinismo, xeroderma pigmentoso, síndrome Rombo, síndrome Bazex-Dupré-Christol, epidermólise bolhosa simplex do tipo Dowling-Meara, múltiplos CBCs hereditários do tipo infundibulocístico e nevo sebáceo (MONTAGNA, LOPES, 2017; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; MARZUKA, BOOK, 2015; TANG *et al.*, 2010; TILLEY, DEEP, AGARWAL, 2015; RIVITTI, 2018; CARDOSO, 2010).

Figura 1. Gene PTCH1. CBC: carcinoma basocelular; SHH: sonic hedgehog.



Fonte: RIVITTI, 2018.

Não há lesões precursoras descritas para o CBC e as células de origem são motivos de controvérsia. Há evidências de origem a partir de células pluripotentes imaturas da epiderme interfolicular e de células da bainha externa do folículo piloso, baseadas em experimentos de ativação da via de sinalização Hedgehog em diferentes compartimentos da epiderme e na expressão das citoqueratinas de padrão folicular, o que levou alguns autores a denominá-lo como neoplasia maligna das células germinativas foliculares (tricoblastos). Adicionalmente, há relatos de associação do CBC a anormalidades do gene embrionário do desenvolvimento folicular, SHH (Sonic Hedgehog), o que suporta o fato da raridade de CBCs palmoplantares (LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; BUSAM, 2018; CAMERON *et al.*, 2019).

2.3 Quadro clínico

Os CBCs são mais comuns na região de cabeça e pescoço (em até 80% dos casos), porém podem acometer tronco, ombros, membros superiores e inferiores,

lábios, mamas, axilas, região inguinal, região genital e perineal (LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; TAKITA, SACHT, 2020).

A classificação do CBC é inicialmente clínica fundamentada na localização, tamanho, aspectos das margens e confirmada pela histologia. Os padrões mais reconhecidos por todos são: nodular, superficial e esclerodermiforme (LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; TAKITA, SACHT, 2020).

Em recente classificação da Organização Mundial da Saúde para tumores de pele (ELDER *et al.*, 2018), segundo também as Diretrizes da National Comprehensive Cancer Network (NCCN, 2016), recomendou-se estratificar o carcinoma basocelular para finalidades de estadiamento e prognóstico em subtipos de baixo e alto risco de recorrência, considerando parâmetros clínicos e anátomo-patológicos (ELDER *et al.*, 2018; TAKITA, SACHT, 2020). A figura 2 demonstra de forma organizada os diversos subtipos histológicos de CBC, classificando-os em baixo e alto risco de recorrência.

Figura 2. Quadro com os subtipos histológicos de carcinoma basocelular (CBC) estratificados de acordo com o risco de recorrência.

BAIXO RISCO	ALTO RISCO
CBC nodular	Carcinoma basoescamoso
CBC superficial	CBC esclerodermiforme (morfeiforme)
CBC pigmentado	CBC infiltrativo
CBC infundibulocístico (Uma variante do CBC com diferenciação anexial)	CBC com diferenciação sarcomatoide
CBC fibroepitelial (tumor de Pinkus)	CBC micronodular

Fonte: ELDER, D.E.; et al. (2018)

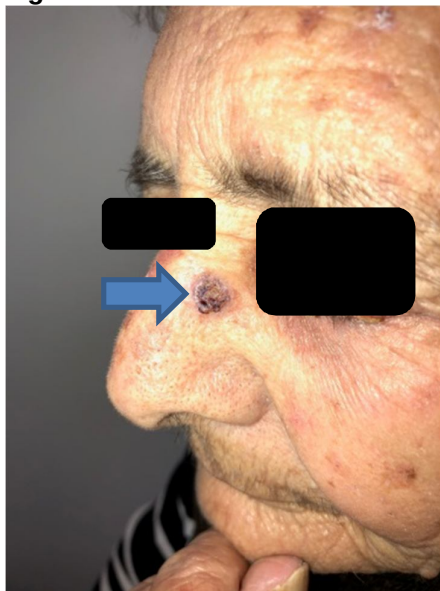
2.4 Subtipos de baixo risco histológico

2.4.1 Carcinoma Basocelular Nodular

É a forma clínica mais comum deste tumor, correspondendo a 44% de todos os CBCs. Clinicamente apresenta-se como pápula ou nódulo assintomático, com superfície translúcida e perlácea. Apresenta ainda vascularização superficial de aspecto arboriforme com coloração de aspecto róseo ou avermelhado. O tamanho do CBC nodular pode variar de 1,0 mm a vários centímetros, mas a média é entre 0,5 a 2,0 cm. Em geral se ulcera, e nesses casos a denominação é CBC nodular ulcerado, que pode sangrar e formar crostas hemáticas. Em alguns casos a úlcera

apresenta características mais infiltrativas, com aderência da tumoração a planos mais profundos – CBC nodular úlcero-infiltrativo (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; TAKITA, SACHT, 2020; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018; CAMERON *et al.*, 2019; ISHI, *et al.*, 2004; CROWSON, 2006) (Figura 3).

Figura 3. CBC nodular.

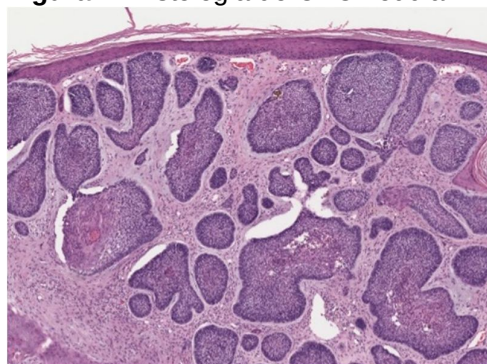


Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente é caracterizado por blocos nodulares de células tumorais na derme, ao menos focalmente não conectadas à epiderme e envolvendo a derme reticular. Os nódulos variam em tamanho e formato, e em geral, apresentam artefato de retração, paliçada periférica e estroma na derme ao redor com alteração mucinosa (estroma fibromixóide) (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; TAKITA, SACHT, 2020; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018; CAMERON *et al.*, 2019; ISHI, *et al.*, 2004; CROWSON, 2006; WEEDON, 2010). (Figura 4).

Pode apresentar focalmente em alguns nódulos pigmentação melânica. Observam-se também figuras de mitose, áreas de queratinização madura, áreas nódulo-císticas ou císticas envolvendo ilhas tumorais, áreas adenóides com ninhos cribriformes. Podemos observar ainda áreas de diferenciação para células claras, em anel de sinete, granulares e células gigantes pleomórficas (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; TAKITA, SACHT, 2020; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018; CAMERON *et al.*, 2019; ISHI, *et al.*, 2004).

Figura 4. Histologia do CBC nodular.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente o CBC nodular pode ser de difícil distinção entre tumores tricoblásticos benignos e malignos, principalmente aqueles que ocorrem em pele lesada pela luz solar (carcinoma tricoblástico/carcinossarcoma e tricoblastoma). Lesões com degeneração cística podem ser de difícil distinção com tumores anexiais, em particular o carcinoma adenoide cístico, e a avaliação imuno-histoquímica deverá auxiliar no diagnóstico. Outro diagnóstico diferencial é o carcinoma de células de Merkel. Neste caso a imuno-histoquímica poderá apresentar positividade para marcadores neuroendócrinos no CBC mas negatividade para citoqueratina 20 (CK20), que será positiva no carcinoma de células de Merkel (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018; CAMERON *et al.*, 2019; ISHI, *et al.*, 2004; TAKITA *et al.*, 2019; SUNJAYA, SUNJAYA, TAN, 2017; RAMEZANI *et al.*, 2016; TAKITA *et al.*, 2019).

2.4.2 Carcinoma basocelular superficial

É a segunda forma clínica mais comum deste tumor e corresponde a cerca de 17% dos casos. Caracteristicamente acomete mais o tronco de pacientes do sexo masculino. Outra particularidade é o maior acometimento de pacientes mais jovens e a presença de múltiplas lesões.

Apresenta-se como placa de crescimento centrífugo que deixa o centro atrófico ou cicatricial. Nesta forma podemos observar também descamação, em geral fina (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 5).

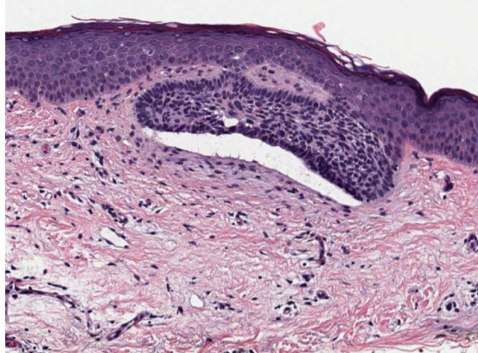
Figura 5. CBC superficial.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente é caracterizado por pequenos ninhos de células neoplásicas na epiderme, intercalados com pele normal sem tumor, e a neoplasia em geral exhibe artefato de retração e paliçada periférica. O estroma ao redor pode apresentar áreas fibromixoides (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 6).

Figura 6. Histologia do CBC superficial.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente os diagnósticos diferenciais são com queratose actínica, tumor de infundíbulo folicular e acantoma de grandes células (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

2.4.3 Carcinoma basocelular pigmentado

É denominação que pode ser utilizada em todas as formas clínicas de CBC. Sua importância deriva de reconhecer o pigmento melânico como componente de formas clínicas de qualquer CBC, auxiliando no diagnóstico diferencial de tumores pigmentados (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

Corresponde a 13,6% dos casos e clinicamente o que caracteriza esta variante é a sua coloração, que varia de castanho a marrom pardacento, podendo ser confundido com melanoma e outras lesões melanocíticas ou produtoras de melanina (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018; MANTESE *et al.*, 2006) (Figura 7).

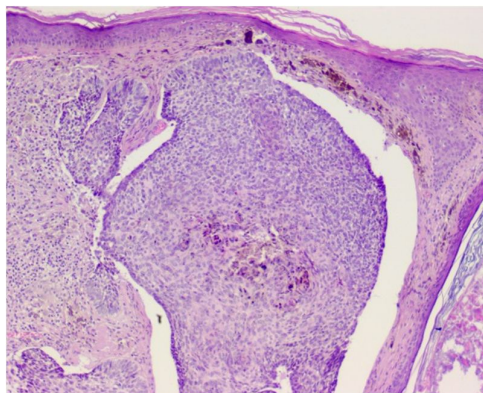
Figura 7. CBC pigmentado.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente as variantes nodular e superficial do CBC podem conter pigmento, sendo categorizadas como CBC pigmentado. O CBC pigmentado contém número aumentado de melanócitos dendríticos benignos dentro das ilhas de células neoplásicas. Observa-se também melanina dentro de macrófagos peritumorais na derme adjacente (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 8).

Figura 8. Histologia do CBC pigmentado.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

O diagnóstico diferencial histológico inclui melanoma, carcinoma espinocelular “in situ” pigmentado, queratose seborreica pigmentada, tricoblastoma pigmentado, porocarcinoma e matricoma melanocítico (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

2.4.4 Carcinoma basocelular infundibulocístico

Trata-se de variante rara de CBC com diferenciação anexial, com predileção pela região peri-ocular (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

Em geral se apresentam como lesões únicas, papulosas, de superfície perlácea, encimadas por escama fina de coloração rósea esbranquiçada (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 9).

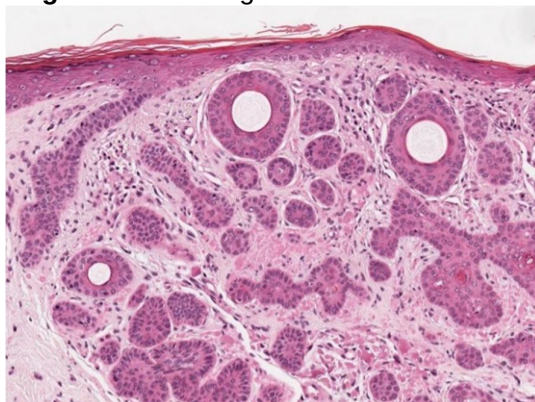
Figura 9. CBC infundibulocístico.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente observam-se estruturas infundibulares com rolhas córneas em áreas císticas, circundadas por ninhos de células basalóides na periferia. A outra forma seria um basocelular com áreas de diferenciação anexial, sebácea ou ductal (ELDER *et al.*, 2018) (Figura 10).

Figura 10. Histologia do CBC infundibulocístico.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

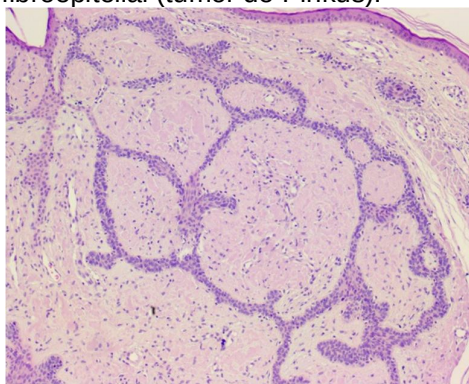
O diagnóstico diferencial histológico do carcinoma basocelular infundibulocístico inclui hamartoma folicular basalóide e tricoepitelioma. O CBC com diferenciação sebácea deve ser distinguido do sebaceoma, adenoma sebáceo e carcinoma sebáceo (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

2.4.5 Carcinoma basocelular fibroepitelial (tumor de Pinkus)

Trata-se de variante rara de carcinoma basocelular acometendo mais comumente o tronco, em particular a região dorsal, e raramente pode ser múltiplo. Apresenta-se, em geral, como nódulo de coloração cor de carne. (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

Histologicamente observam-se filamentos e cordões de células basalóides se originando da epiderme e formando estruturas anastomosantes em meio a estroma fibrótico da derme, e ilhas de células basalóides podem estar presentes (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 11).

Figura 11. Histologia do CBC fibroepitelial (tumor de Pinkus).



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Deve ser diferenciado do siringofibroadenoma écrino, pela ausência de epitélio ductal écrino e cutícula nos blocos de células basalóides e pela predominância desse tipo de lesão no tronco em vez da região acral no CBC (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

2.5 Subtipos de alto risco histológico

2.5.1 Carcinoma basoescamoso

Também denominado carcinoma metatípico, é considerado uma variante agressiva do CBC, com achados histológicos de CBC e CEC, apresentando zonas de transição entre ambos. Geralmente acomete pessoas idosas, de pele clara, em áreas fotoexpostas. Corresponde a 7,4% dos CBCs. Apresenta-se como pápula ou nódulo de evolução lenta que pode ulcerar, apresentar comportamento clínico agressivo, com maior possibilidade de recorrência e metástase (CHINEM, MIOT, 2011; NASSER, 2005; HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 12).

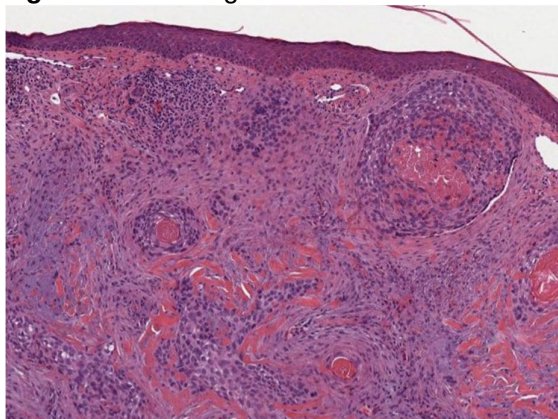
Figura 12. Carcinoma basoescamoso.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente apresenta alterações características de carcinoma basocelular e diferenciação escamosa em graus variáveis (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 13).

Figura 13. Histologia do carcinoma basoescamoso.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente deve ser distinto do CBC queratótico (um subtipo de CBC nodular) pela presença de epitélio escamoso citologicamente maligno e pela ausência de pérolas córneas em região central dos nódulos tumorais. Também deve ser distinguido de tumores de colisão com CBC e CEC (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

2.5.2 Carcinoma basocelular esclerodermiforme (Morfeiforme)

É variante agressiva de carcinoma basocelular caracterizada por delgados cordões de células basalóides de limites imprecisos, sem a presença de paliçada na periferia, circundados por abundante estroma fibroso, por vezes desmoplásico, com capacidade de invadir a hipoderme. Corresponde a cerca de 1% dos CBCs. Apresenta-se como placa de padrão cicatricial com bordos mal definidos, que raramente se ulcera ou sangra (CHINEM, MIOT, 2011; NASSER, 2005; HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 14)

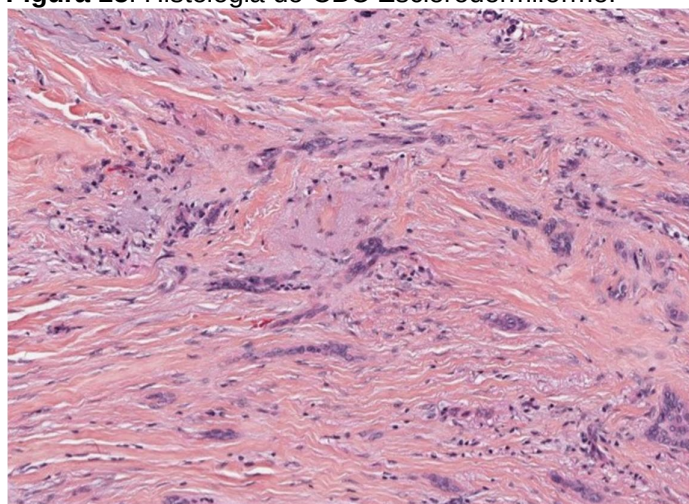
Figura 14. CBC Esclerodermiforme.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente revela colunas filiformes infiltrativas de células basalóides com espessura de uma a cinco células em um estroma fibroesclerótico, sem fendas ou paliçada periférica. Frequentemente há sobreposição ou se confunde com o CBC infiltrativo (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018; WEEDON, 2010). (Figura 15).

Figura 15. Histologia do CBC Esclerodermiforme.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Deve ser distinto do tricoepitelioma desmoplásico e carcinoma anaxial microcístico, e a imuno-histoquímica facilitará esta distinção. Em geral utiliza-se painel de marcadores onde a demonstração de RA +, CK20 – e PHLDA –, favorece

a possibilidade de tricoepitelioma e CEA +, CK15 +, EMA + e BerEP4 –, favorece diagnóstico de carcinoma anexial microscístico (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018, 2018; SUNJAYA, SUNJAYA, TAN, 2017; RAMEZANI *et al.*, 2016).

2.5.3 Carcinoma basocelular infiltrativo

É variante agressiva de carcinoma basocelular nodular. Corresponde a 7% dos casos. Apresenta-se como lesão de padrão cicatricial, mais frequente no tronco superior, cabeça e pescoço, geralmente mais comum em pacientes abaixo dos 35 anos. A biópsia deve incluir a derme profunda para um diagnóstico mais correto (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; OCANHA *et al.*, 2011; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 16).

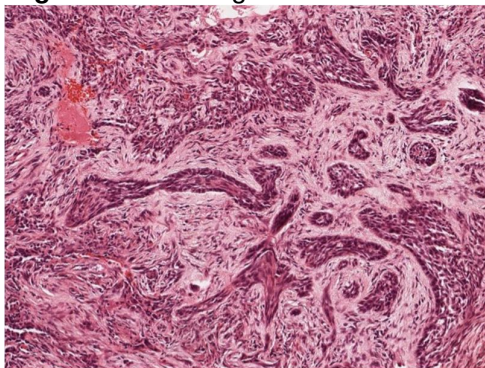
Figura 16. CBC infiltrativo.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente apresenta ninhos irregulares de células basalóides, de tamanhos variados, com padrão tentacular, infiltrando o estroma dérmico com espessura de cinco a oito células. Um terço dos CBCs infiltrativos se misturam com componente de CBC nodular. A invasão perineural e a sobreposição com o CBC esclerodermiforme podem ser observados (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018). (Figura 17).

Figura 17: Histologia do CBC infiltrativo.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Pode ser confundido com carcinoma basocelular esclerodermiforme. A presença de infiltração neoplásica perineural favorece o diagnóstico de CBC infiltrativo (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; VASEF *et al.*, 2020; BUSAM, 2018).

2.5.4 Carcinoma basocelular com diferenciação sarcomatóide

É variante agressiva muito rara de carcinoma basocelular, com componente epitelial basalóide e estroma sarcomatóide de histologia variável. Ocorre predominantemente em homens idosos, em áreas fotoexpostas da cabeça e pescoço, tórax e antebraços, e os tumores são grandes, em média de 2,8 cm (ELDER *et al.*, 2018; BUSAM, 2018).

Histologicamente apresenta componente basocelular e componente mesenquimal maligno constituído ou por células pleomórficas indiferenciadas, osteossarcoma, condrossarcoma, leiomiossarcoma e/ou rabdomiossarcoma. Representa em geral o resultado de uma diferenciação mesenquimal divergente. Trata-se de tumor bifenotípico, e a correta caracterização deve ser voltada para o componente neoplásico mesenquimal (Por exemplo: pleomórfico indiferenciado, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, etc.). A avaliação imuno-histoquímica é fundamental para definição (ELDER *et al.*, 2018; BUSAM, 2018).

2.5.5 Carcinoma basocelular micronodular

É variante histológica de alto risco do CBC, rara na sua forma pura, correspondendo a menos que 15% dos CBCs. Pode se apresentar como pequenas pápulas ou placas de superfície e extensão pouco definidas, mais comum em região da cabeça e pescoço. Como infiltra profundamente a derme, pode recorrer após a cirurgia, daí ser considerada uma variante de alto risco do CBC (BERNARD *et al.*, 2008; HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; BUSAM, 2018). (Figura 18).

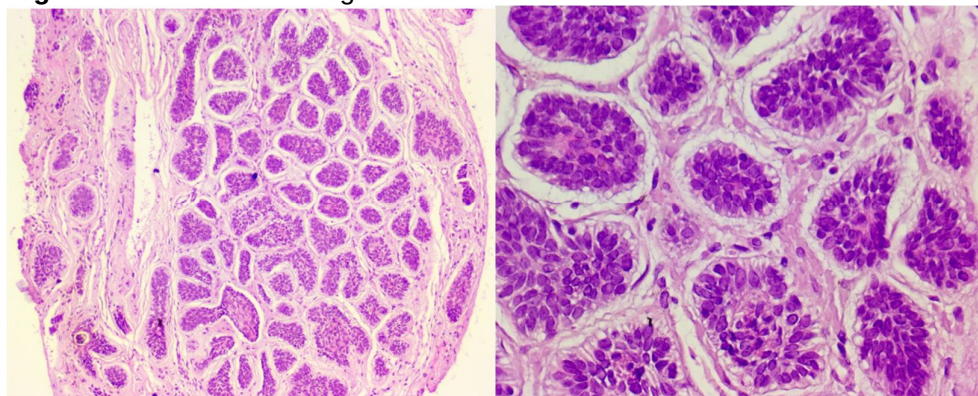
Figura 18. CBC Micronodular



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

Histologicamente são nódulos menores de células basalóides (menores que 0,15 mm em diâmetro) comparados com o CBC nodular. Há fendas e paliçada periférica, e a derme reticular ao redor é fibromixóide. Pode demonstrar infiltração perineural e da hipoderme com pequenos nódulos satélites em derme profunda (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; BUSAM, 2018; WEEDON, 2010). (Figuras 19a e 19b).

Figuras 19a e 19b: Histologia do CBC Micronodular.



Fonte: TAKITA, SACHT, 2020.

O diagnóstico diferencial inclui o CBC nodular com arquitetura focal micronodular, mas estes tumores são envoltos por um estroma comum e apresentam ausência de nódulos satélites na vizinhança (HOANG, 2017; ELDER *et al.*, 2018; LUPI, RIBEIRO, HOFF, 2019; BUSAM, 2018).

2.6 Evidências de inflamação na carcinogênese

A inflamação é um componente essencial da imunidade inata, permitindo que organismos multicelulares restabeleçam a homeostasia frente a estímulos ou condições nocivas, tais como infecções com ou sem lesão tecidual.

A resposta inflamatória depende, basicamente, de quatro componentes: indutores, moléculas de reconhecimento celular ou solúveis, mediadores inflamatórios e tecido-alvo. Quando esse fenômeno se torna desregulado e persistente, a resposta celular passa a se caracterizar como uma inflamação crônica.

Segundo a origem dos agentes indutores, podemos dividir os eventos inflamatórios associados ao câncer em extrínsecos (por exemplo, inflamação crônica causada por patógenos ou por agentes ambientais) e intrínsecos (por exemplo, inflamação induzida por alterações genéticas em células pré-malignas ou por necrose tumoral).

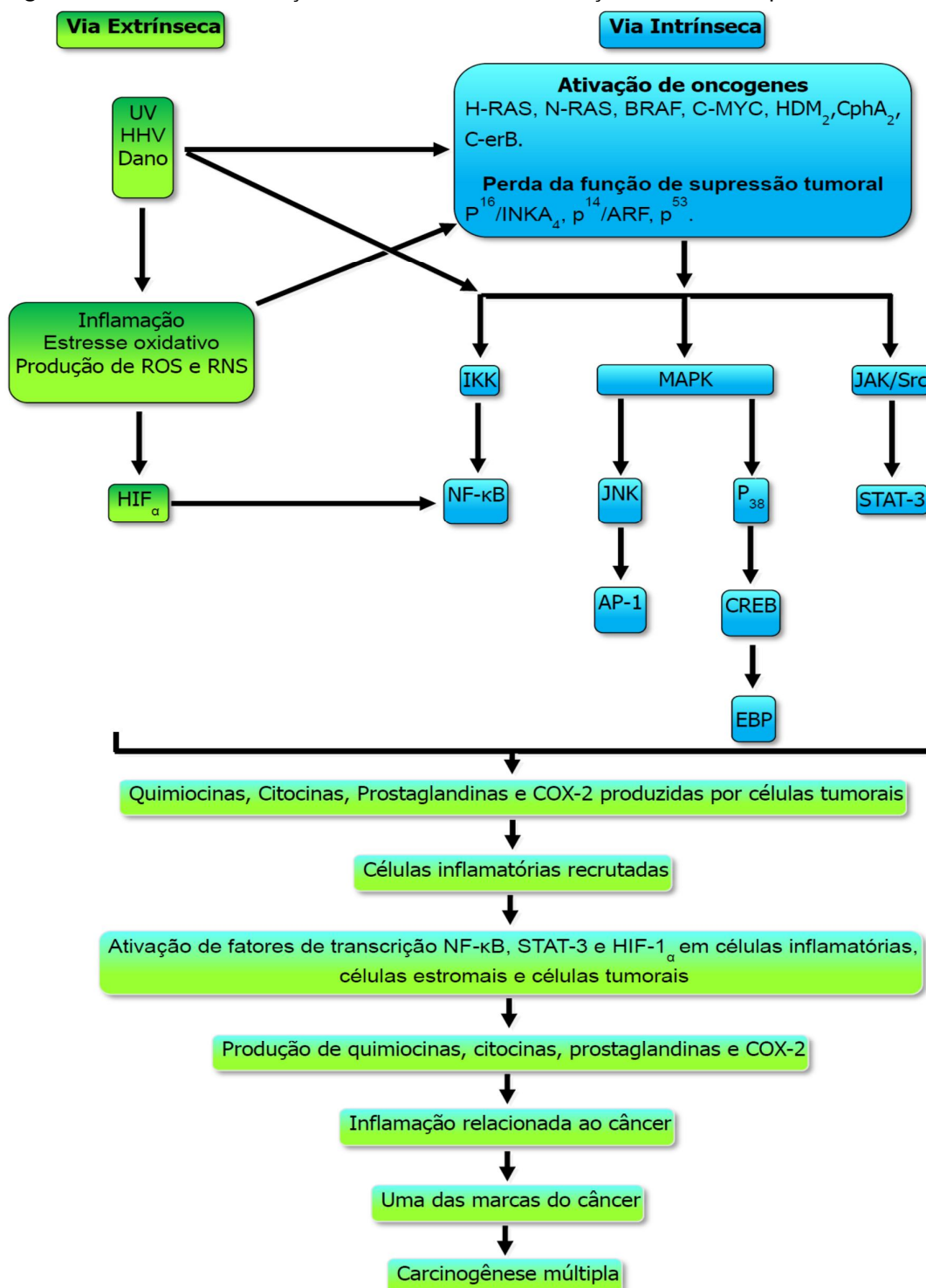
A presença de um infiltrado leucocitário, sobretudo de macrófagos associados ao tumor, representa uma característica marcante de praticamente todos os cânceres (SOUSA, CUNHA, 2013; STCLAIR, BAR-SAGI, 2012; RIZZO, LEPIQUE, 2015).

A presença de um microambiente inflamatório, com altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), de citocinas e de eicosanóides, propicia a ocorrência de lesão direta no DNA, instabilidade genética e alterações epigenéticas em células pré-malignas, favorecendo a iniciação tumoral.

Os mediadores inflamatórios presentes no microambiente tumoral iniciam, em células tumorais, cascatas de sinalização intracelulares, culminando com a ativação de fatores de transcrição, tais como *Factor Nuclear Kappa B* (NF- κ B) e *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3). Esses fatores regulam a transcrição de genes associados à resposta inflamatória, tais como citocinas (IL-6, IL-1 β). Fatores de crescimento (CSF-1), quimiocinas e seus receptores (IL-8, CCL2, CCL20, CXCR4), metaloproteínas da matriz (MMP-2 e MMP-9), ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e de vários genes associados à carcinogênese, representando o ponto de convergência entre inflamação e câncer (CORREA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2016; CHIACCHIO, CUCE, 1997; FERNANDES *et al.*, 2015; JIA *et al.*, 2016; CIUREA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2019; MARU *et al.*, 2014; NEAGU *et al.*, 2019; SOUZA, CUNHA, 2013; ST.CLAIR, BAR-SAGI, 2012; RIZZO, LEPIQUE, 2015; PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016; KUZNETSOVA *et al.*, 2016; BRIDGE *et al.*, 2018; SALAN *et al.*, 2018; SIVRIKOZ *et al.*, 2015; CASTILLO *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2014; MANTOVANI *et al.*, 2010; GOZDZIALSKA *et al.*, 2016; EL-KHALAWANY, ABOU-BAKR, 2013; CIAZYNSKA *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2008; MOHIAN *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2013; KARAHAN *et al.*, 2011; WANG, DUBOIS, 2010).

Evidências que sugerem estreita associação entre inflamação e câncer, foram relatadas por diversos autores (PUIZINA-IVIC *et al.*, 2008; MARU *et al.*, 2014; AGGARWAL, VIJAYALEKSHMI, SUNG, 2009; MANTOVANI *et al.*, 2010; GRIVENNIKOV, GRETEN, KARIN, 2010; PRASAD, AGGARWALL, 2015). A figura 20 apresenta, de maneira detalhada, as vias de sinalização associadas a inflamação e o câncer de pele.

Figura 20. Vias de sinalização associadas com inflamação e câncer de pele.



Fonte: Adaptado de MARU *et al.* (2014).

2.7 Evidências de inflamação na tumorigênese de carcinomas basocelulares

Nos EUA estima-se que 2,8 milhões de novos pacientes sejam diagnosticados a cada ano atualmente, sendo um grande problema de saúde pública. Uma das características do CBC é a ativação contínua da via de sinalização *Hedgehog* devido a mutações no gene supressor tumoral *patched* (PTCH), que induz inativação ou devido a mutação em *Smoothed* que leva à ativação. Essas mutações foram consideradas bons candidatos a alvos terapêuticos, com abordagens anti-inflamatórias diretas, e ensaios clínicos foram realizados com drogas anti-inflamatórias como difluorodimetilornitina, retinóides, drogas anti-inflamatórias não-esteróides (AINES), dinucleotídeo timidina, vitamina D3, silibinina e componentes de chás verdes e pretos (GHITA, 2016; TILLEY, DEEP, AGARWAL, 2015).

Outra via de sinalização da inflamação associada ao CBC é a NF- κ B, que é dependente da I κ B quinase α (IKK α). Demonstrou-se que a IKK α nuclear se liga a fatores promotores de inflamação; além disso, parece que ele se une a um marcador de células-tronco, o LGR5 (*Leucine-Rich Repeat-Containing G-Protein Coupled Receptor 5*) que ativa a via de sinalização STAT3 durante a tumorigênese. Eliminando o IKK α , o crescimento tumoral e o processo de EMT (*Epithelial-Mesenchymal Transition*) são inibidos provando que o IKK α é um fator transformador oncogênico através de perda de células-tronco e ativação de genes relacionados a inflamação. Isto mostra que o CBC é diretamente relacionado com o microambiente tumoral inflamatório (JIA *et al.*, 2016).

Outra das vias relacionadas a inflamação no CBC é a via do fator de transcrição SRY (*Sex Determining Region Y*) relacionado a família HMG-box - high mobility group box (*Transcription Factor SOX-9*). Em modelo animal em ratos com CBC foi visto que SOX9 é expressado na iniciação tumoral e que sua expressão é dependente da via Wnt/ β -catenina. Neste modelo genético a deleção de SOX9 e a ativação constitutiva da via de sinalização *Hedgehog* suprime a iniciação do CBC destacada pelo envolvimento de SOX9 na perda de células-tronco, remodelamento da matriz extracelular e de diferenciação do desenvolvimento tumoral e metastático (LARSIMONT *et al.*, 2015).

Em outro modelo experimental usando ratos SENCAR a inflamação foi induzida por radiação UVB e a iniciação tumoral na pele foi estudada.

Foi relatada que a expressão de PTK6 (Proteína tirosina quinase 6) estava aumentada sob a ação da UVB. Em ratos SENCAR Ptk6 ^{+/+} e Ptk6 ^{-/-}, expostos a radiação UVB, foi visto que nos ratos Ptk6 ^{+/+} a UVB induz inflamação e aumento de expressão de PTK6 nas células epiteliais basais da epiderme. Esta exposição foi relacionada com maior frequência de tumores e carga tumoral comparada com os ratos SENCAR Ptk6 ^{-/-}. Em humanos com CEC (carcinoma espinocelular) a ativação do PTK6 está bastante acentuada. Parece que o PTK6 contribui com a inflamação dependente de radiação UVB e com o aumento posterior da tumorigênese na pele (CHASTKOFISKY *et al.*, 2015).

Em pacientes com CBC existe uma procura constante de células imunes relacionadas com a inflamação que possa prognosticar sua evolução, tais células são os neutrófilos, monócitos e linfócitos. Em estudo retrospectivo recente da contagem de células brancas sanguíneas em menos de 500 pacientes, foi observado que no grupo dos CBCs a contagem de neutrófilos e monócitos estava diminuída em relação ao grupo controle. A proporção neutrófilo/linfócito foi de 3,24 em CBC e 3,59 em CEC quando comparada a 5,06 no grupo controle (BAYKAN, CIHAN, OZYURT, 2015).

Como os cânceres de pele não-melanoma estão associados fortemente com excessiva radiação UV, há numerosos estudos acerca da associação do risco para câncer de pele associados à vitamina D. O sistema endócrino e a vitamina D estão associados com inflamação, crescimento celular e diferenciação (LUPU *et al.*, 2017).

A vitamina D atua através de sua ligação com o receptor de vitamina D (VDR). Em um grande estudo envolvendo cerca de 17.000 casos de CBC comparados a mais de 250.000 controles, polimorfismos 2 single-nucleotide (SNPs) em novo loci foi encontrado relacionado ao risco de CBC. O estudo aponta que variações hereditárias comuns em VDR são relacionadas ao desenvolvimento de CBC (LIN *et al.*, 2017). Outro estudo utilizando modelo de pele animal mostrou que mastócitos expressando VDR, estão envolvidos na imunossupressão UV mediada pela expressão de VDR de CYP24A1 (uma hidroxilase) que inativa metabólitos da vitamina D₃. Em pele normal acima de 2,9% dos mastócitos eram CYP24A1⁺, com uma alta porcentagem de mastócitos CYP24A1⁺ em queratose actínica (AK), CEC e

CBC. Os achados de mastócitos CYP24A1⁺ aumentados em câncer de pele derivados de queratinócitos necessita de estudos posteriores (KAUKINEN *et al.*, 2017).

Da mesma forma que em outros órgãos, a expressão aumentada de CYP24A1 na pele pode ser correlacionada com modelos murinos de inflamação e fibrose progressiva (WEIDENBUSCH *et al.*, 2017).

O processo de tumorigênese inclui vários mecanismos adicionais tais como neovascularização, invasão tecidual, e metástase. Todos esses processos envolvem remodelação tecidual onde o sistema uroquinase é altamente envolvido. Em outro estudo demonstrou-se que o CBC está associado com hiperproliferação de queratinócitos, migração celular inflamatória e processos de angiogênese, e observaram que a expressão aumentada de receptor ativador de plasminogênio de uroquinase (uPAR) está presente no estroma tumoral circundante ao CBC. Portanto, o sistema uPAR é uma rede molecular que sustenta a agressividade proliferativa e a invasão celular tumoral (RUBINA *et al.*, 2017).

Outro sistema molecular que favorece a inflamação e remodelamento tecidual na tumorigênese é a metaloproteinase (MMP). Sua ativação está envolvida na degradação da membrana basal em processos tais como inflamação, cicatrização tecidual, angiogênese e carcinogênese. No CBC, a expressão de MMP-1 e MMP-9 foi observada associada com a progressão da doença. Baixos níveis foram detectados em queratose actínica (AK), enquanto que expressão intensa foi encontrada em diferentes tipos de CBC (KUZNETSOVA *et al.*, 2016).

Vários compostos anti-inflamatórios embasam prova da associação de inflamação com tumorigênese. O naproxeno, um composto anti-inflamatório conhecido, mostra uma ação anti-proliferativa e pró-apoptótica. Um estudo usando modelo animal de rato com tumorigênese de pele induzida por UVB observou-se que o naproxeno inibiu significativamente tanto o CBC como o CEC. A inibição foi observada no número e no volume de lesões e as principais reduções foram nos tumores do tipo CBC. Os efeitos estavam associados com decréscimo na expressão de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e ciclina D1, aumento de apoptose e de moléculas relacionadas a inflamação (*e.g.*, iNOS, COX-2, nuclear NF-kB e p65). Mesmo tumores residuais, após terapia com naproxeno, apresentaram um potencial agressivo mais baixo, expressão de marcadores de EMT (*Epithelial-mesenchymal*

transition), como por exemplo a N-caderina, vimentina, Snail e Twist) e expressão aumentada de E-caderina (CHAUDHARY *et al.*, 2017).

Em relação às estratégias terapêuticas, temos disponível o Imiquimod que é um agonista de TLR7 (*Toll Like Receptor-7*), que endereça um receptor derivado de inflamação, e que foi aprovado para tratamento de CEC *in situ*, e mais recentemente, foi empregado para tratamento de CBC superficial com resultados clínicos positivos. Estes resultados mostram uma estratégia terapêutica que reduz a tumorigênese (PAPAKOSTAS, STOCKFLETH, 2015).

Outros compostos anti-inflamatórios clássicos tais como aspirina e outras drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) tem sido testados em CBC. Coletivamente, dados de 11 estudos clínicos mostraram uma redução de risco de 10% de CBCs em pacientes usando AINEs enquanto que o uso de aspirina isolada teve uma redução menor no risco. Este relato ressalta que em humanos o uso de AINEs pode ser utilizado em população de alto risco para reduzir a iniciação de CBCs (MURANUSHI *et al.*, 2016).

2.8 Revisão dos biomarcadores utilizados na pesquisa

COX-2 ou ciclooxigenase-2 - faz parte de um grupo de enzimas, COX-1 e COX-2, críticas na biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. A proteína COX-1 humana é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos e exerce funções na manutenção da homeostasia tecidual.

Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINEs) são efetivas na diminuição da resposta inflamatória bloqueando ambas as enzimas COX. COX-2 é uma proteína indutora de 70kD que é responsável pela síntese de prostaglandina no sítio inflamatório, não ocorrendo em tecidos normais. A sua expressão também tem sido relacionada com a carcinogênese e inibidores específicos de COX-2 apresentam efeitos anti-tumorais. Expressão de COX-2 por imuno-histoquímica tem sido relatada numa variedade de tecidos neoplásicos. Entre os tecidos neoplásicos a expressão citoplasmática de COX-2 foi demonstrada em: adenocarcinoma colorretal, subconjunto de adenocarcinomas ductais da mama, adenocarcinomas pulmonares, na maioria de carcinomas escamosos do esôfago, carcinomas adenoescamosos do esôfago, gliomas, melanomas, adenocarcinoma gástrico, carcinoma espinocelular de

cabeça e pescoço, carcinoma pancreático, feocromocitoma, câncer testicular, carcinoma escamoso da bexiga, um subconjunto de carcinomas de ovário, subconjunto de carcinomas da próstata, subconjunto de carcinoma transicional invasivo de bexiga, subconjunto de carcinoma de células renais e subconjunto de carcinoma hepatocelular (SANO *et al*, 1995; SHEEHAN *et al*, 1999; HLA, NEILSON, 1992; STRATTON, ALBERTS, 2002; MASFERRER *et al*, 2000; HALF *et al*, 2002; ACHIWA *et al*, 1999; HOSOMI *et al*, 2000; ZIMMERMANN *et al*, 1999; SHONO *et al*, 2001; DENKERT *et al*, 2001; LIM *et al*, 2000; CHAN *et al*, 1999; OKAMI *et al*, 1999; TUCKER *et al*, 1999; SALMENKIVI *et al*, 2001; HASE *et al*, 2003; SHIRAHAMA, SAKAKURA, 2001; KIRSCHENBAUM *et al*, 2000; MOHAMMED *et al*, 1999).

CXCR4 - as quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas secretadas por várias células sobre influência de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e células cancerígenas. Estas quimiocinas regulam o transporte celular, especialmente recrutando leucócitos para os seus sítios alvos, e tem um papel importante, não somente nas reações inflamatórias e imunes, como também na progressão do câncer, segundo Oliveira (2008). As quimiocinas constituem uma superfamília de pequenas proteínas (8-14kD), da qual participam mais de 50 quimiocinas que exercem a sua ação via interação com receptores específicos. Elas são subdivididas em quatro famílias: CXC, CC, XC e CX3C, dependendo do posicionamento do resíduo de cisteína no N-terminal da molécula proteica. Nestas moléculas, C representa resíduos de cisteína e X é qualquer outro resíduo de aminoácido. As quimiocinas CC apresentam um rearranjo de uma cisteína adjacente à outra.

As quimiocinas CXC tem 4 resíduos de cisteínas, sendo que os 2 primeiros resíduos de cisteínas conservados são separados dos outros 2 resíduos de cisteína por 1 resíduo de aminoácido não conservado, como observado no receptor CXCR4 e seu ligante SDF-1 α (*Stromal Cell-Derived Factor-1* ou CXCL12), de acordo com Oliveira (2008). A divisão das quimiocinas CXC é baseada na presença ou ausência da sequência ELR (Glu-Leu-Arg) localizadas na região N-terminal da proteína (ELR+). As quimiocinas ELR+ apresentam uma importante implicação fisiológica em termos angiogênicos, enquanto que as quimiocinas não-ELR (ou ELR-) são anti-angiogênicas ou angiostáticas. A ligação das quimiocinas aos seus respectivos receptores acoplados na proteína G e presentes na membrana plasmática de células

alvo, leva à reorganização do citoesqueleto e adesão com células endoteliais levando à migração destas células. A transmigração dos leucócitos ocorre no sistema vascular através das células do endotélio, processo que envolve cascata sequencial de citocinas pró-inflamatórias secretadas e presentes na superfície dessas células, tais como TNF α (*Fator de necrose tumoral alfa*), IFN- γ (*Interferon gama*) e IL-1 β (Interleucina 1 beta), moléculas de adesão e quimiocinas. As citocinas se ligam às cadeias dos proteoglicanos presentes na superfície das células endoteliais e componentes da matriz extracelular, promovendo uma sinalização direcional que as células podem usar para navegar em regiões inflamatórias. Esta reação provoca adesão dos leucócitos aos sítios específicos nos vasos sanguíneos e faz com que ultrapassem a barreira do tecido, migrando para outros órgãos. As quimiocinas interferem na oncogênese de três maneiras: inicialmente, controlando a infiltração leucocitária. Os leucócitos podem contribuir para a sobrevivência do tumor como fonte de fatores de crescimento e angiogênese. Posteriormente, várias quimiocinas agem como fatores de crescimento para as células tumorais, como por exemplo, IL-8 (ou CXCL8) e CXCL1/GRO α (C-X-C ligand 1/*Melanoma growth stimulating activity*), os quais estimulam o crescimento de carcinomas broncogênicos e melanoma, respectivamente. E, finalmente, as quimiocinas influenciam a migração de células tumorais (OLIVEIRA, 2008).

Metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) - as metaloproteinases da matriz (MMPs) constituem uma família de endopeptidases estruturalmente relacionadas, zinco-dependentes, que coletivamente são capazes de degradar a membrana basal e virtualmente todos os outros componentes da matriz extracelular (ECM).

As MMPs são produzidas como precursores inativos contendo uma sequência de sinais secretórios e um pró-peptídeo. A clivagem proteolítica desse pró-peptídeo é requerida para a ativação da MMP. A MMP-9 exerce um papel crítico na invasão tumoral e metástase, bem como na angiogênese. No tecido canceroso, a expressão de MMP-9 pode ser induzida nas células estromais pela infiltração de células neoplásicas, por contato direto célula-célula, de maneira parácrina, ou como resultado de um estímulo por fatores de crescimento liberados pela degradação da matriz extracelular no processo de invasão. A expressão de MMP-9 está aumentada em praticamente todo tipo de câncer humano e isto em geral correlaciona-se com um estadiamento avançado, aumento da invasão, metástase e uma curta sobrevida.

Uma das exceções é o câncer de cólon onde a presença de macrófagos expressando MMP-9 tem sido associada com tendência metastática reduzida (ILLEMANN *et al.*, 2006; EGBLAD, 2002; STAMENKOVIC, 2003).

Bcl-2 - o gene Bcl-2 foi identificado a mais de uma década atrás com o descobrimento e análise da translocação t (14;18) (q32;q21). Esta translocação ocorre em 70-80% dos linfomas foliculares. Isto resulta numa superexpressão do alelo Bcl-2 translocado induzido por estímulos na região IgH, ainda que a translocação não seja um pré-requisito para a expressão da proteína Bcl-2, uma vez que isto ocorre em muitos casos sem o rearranjo. O polipeptídeo Bcl-2 é uma oncoproteína de 26kDa, ele é um inibidor da morte celular apoptótica encontrado principalmente nas membranas intracelulares mitocondriais e nucleares e no retículo endoplasmático liso, mais do que nas superfícies celulares. As experiências de transferência de genes demonstraram que níveis elevados desta proteína podem proteger uma grande variedade de células contra vários estímulos de morte celular que vão desde a supressão do fator de crescimento e das linfocinas citotóxicas às infecções virais e deterioração do DNA, medicamentos anticancerígenos e radiação. O gene Bcl-2 está envolvido na translocação cromossômica t (14;18) encontrada na maioria dos linfomas foliculares humanos e em alguns dos linfomas difusos de células B. Nesta translocação, o gene Bcl-2 no seguimento cromossômico 18q21 está justaposto ao local da cadeia pesada da Ig no 14q32, resultando numa expressão desregulada da oncoproteína Bcl-2 (ADAMS, CORY, 1998; KUSENDA, 1998; YANG, KORSMEYER, 1996).

Ki-67 - Ki-67 é uma proteína não-histônica, de meia-vida curta – aproximadamente 90 minutos, presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na G0, e em todos os tipos celulares com capacidade proliferativa. Em relação à intensidade da presença do Ki-67 nas diferentes fases do ciclo celular, mais especificamente nas fases S e G2, ela aumenta com máxima intensidade na metáfase começando a diminuir na telófase. A depender da fase do ciclo celular, o Ki-67 poderá ser localizado no núcleo (G1), no nucléolo (S e G2), na superfície dos cromossomos (metáfase) ou difuso no citoplasma após a rotura da membrana nuclear, sendo também descrito no citoplasma durante a fase S. Observa-se que este marcador vem sendo estudado há mais de 30 anos, e estudos recentes tem sido desenvolvidos no sentido de identificar métodos imuno-histoquímicos para

determinar seu valor prognóstico (HEIDEBRECHT *et al.* 1996; SCHOLZEN, GERDES, 2000; Du MANOIR *et al.*, 1991; STARBORG *et al.*, 1996; KILL, 1996; BRAUN *et al.*, 1988; VAN DIERENDONCK *et al.*, 1989; PLAVETIC *et al.*, 2015).

BerEP4 - o antígeno epitelial consiste numa proteína transmembranosa que funciona como uma molécula de adesão celular. Este antígeno específico do epitélio é amplamente distribuído nas células epiteliais e apresenta uma forte expressão nos carcinomas. Entre as exceções nos epitélios normais temos os hepatócitos do adulto, células parietais nas glândulas gástricas e células apicais do epitélio escamoso, todos negativos para o antígeno epitelial. O antígeno epitelial raramente está presente nos mesoteliomas. Foi relatado que o antígeno epitelial desempenha um papel importante enquanto marcador de células tumorais nos linfonodos com carcinoma de esôfago, que de outro modo seria classificado como linfonodo-negativo. Sugeriu-se igualmente que o antígeno epitelial é um diferenciador entre os carcinomas basocelulares, o carcinoma escamoso e basoescamoso da pele (HOSCH *et al.*, 2000; LATZA *et al.*, 1990; MOMBURG *et al.*, 1987; SHEIBANI *et al.* 1991; BEER, SHEPHERD, THEAKER, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a expressão de biomarcadores inflamatórios (COX-2, CXCR4, MMP-9), marcadores de carcinoma basocelular (Ber-EP4, Bcl-2) e de proliferação celular (Ki-67) em subtipos histológicos de baixo (CBC nodular) e alto risco de recorrência do carcinoma basocelular (CBC esclerodermiforme e CBC micronodular).

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a intensidade da expressão de cada marcador biológico (COX-2, CXCR4, MMP-9, Ber-EP4, Bcl-2, Ki-67) através do método imuno-histoquímico, nos dois grupos de subtipos histológicos de carcinomas basocelulares (baixo e alto risco de recorrência).

Comparar e correlacionar estatisticamente os resultados das imunocolorações nos dois grupos de subtipos histológicos de carcinomas basocelulares (baixo e alto risco de recorrência).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada no CEP (Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos) da UFMS (Anexo 2). Os tumores foram selecionados entre os registrados no setor de Dermatopatologia do Serviço de Dermatologia do HUMAP/EBSERH/UFMS, no período de 2015 a 2018, a partir dos relatórios de exames histopatológicos.

4.1.1 Critérios de inclusão

- a) Acima de 18 anos de ambos os sexos;
- b) Diagnóstico histopatológico de carcinoma basocelular, subtipos de baixo risco de recorrência (nodular) e de alto risco de recorrência (esclerodermiforme e micronodular).

4.1.2 Critérios de exclusão

- a) Gestantes;
- b) Indígenas.

As lâminas histológicas registradas com tumores basocelulares foram revisadas por dois patologistas independentes e classificadas segundo critérios de Weedon (2010), em dois subtipos histológicos:

- a) Carcinoma basocelular nodular
- b) Carcinoma basocelular esclerodermiforme e micronodular

Foram estudadas 40 amostras teciduais com diagnóstico histológico de carcinoma basocelular, assim distribuídos:

- a) 25 amostras com diagnóstico de CBC nodular (n=25);
- b) 6 amostras com diagnóstico de CBC esclerodermiforme (n=6);
- c) 9 amostras com diagnóstico de CBC micronodular (n=9).

Foram analisadas amostras teciduais de um grupo de CBCs nodulares (n=25), de baixo risco de recorrência e um grupo englobando CBCs esclerodermiformes (n=6) e CBCs micronodulares (n=9), de alto risco de recorrência.

As informações obtidas nos prontuários de atendimento foram: a idade, o gênero, a topografia do tumor e os fototipos (anexo 1). Os blocos de parafina arquivados foram submetidos a 7 novos cortes histológicos: um para coloração com hematoxilina-eosina (HE) com finalidade de confirmar o subtipo histológico e seis para aplicação dos anticorpos primários através de imuno-histoquímica.

As lâminas histológicas desses espécimes foram submetidas ao protocolo de marcação imuno-histoquímica para os marcadores COX-2, CXCR4, MMP-9, Ber-EP4, Bcl-2 e Ki-67.

As reações de cada anticorpo foram realizadas no mesmo momento sob o mesmo protocolo. Controles positivos e negativos de cada marcação foram realizados para cada anticorpo.

4.2 Técnica de imuno-histoquímica (TAYLOR, RUDBECK, 2013)

A técnica de imuno-histoquímica requer 4 passos:

- 1) Preparação das amostras;
- 2) Recuperação antigênica;
- 3) Desparafinização;
- 4) Reação de imuno-histoquímica.

No primeiro passo, os blocos foram seccionados para obtenção dos cortes histológicos, que foram estendidos em lâminas histológicas. Os 6 anticorpos primários (marcadores) utilizados nesse estudo foram: COX-2 (clone CX-294, DAKO), CXCR4 (clone ab124824, abcam), MMP-9 (clone ab76003, abcam) Ber-EP4 (clone Ber-EP4, DAKO), Bcl-2 (clone 124, DAKO) e Ki-67 (clone MIB-1, DAKO).

4.3 Equipamentos utilizados na imuno-histoquímica:

PT LINK (marca: DAKO) e COVERSLEEPER (marca: DAKO).

4.4 Reação imuno-histoquímica – procedimentos

4.4.1 Cortes histológicos

- Os blocos foram entregues à área de histotécnica após a triagem (identificação), e colocados no freezer para gelar;
- Após resfriamento do bloco, foram realizados cortes de 3 micras em micrótomo manual;
- Os cortes foram colocados em banho maria à +/-65°C e "pescados" nas lâminas já identificadas com o número do caso;
- Tais lâminas foram colocadas em estufa à 60°C por 40 minutos para o início da desparafinização.

4.4.2 Preparação

4.4.2.1 Período noturno

- As lâminas foram colocadas em berços de coloração devidamente numeradas para serem distribuídas nos tanques do PT-Link e de acordo com o PH determinado.
- Foram fechados os PT-Link, fazendo-se a programação na tela do menu do equipamento, verificando o horário, dia da semana, temperatura e programação de início do processo.
- Finalmente verificando se o NO-BREAK estava ativo corretamente, a fim de garantir o início do processo no período da manhã.

4.4.2.2 Período da manhã

- O processo de desparafinização e hidratação das lâminas ocorreram nas máquinas PT-Link com água deionizada e soluções prontas de ph baixo e ph alto que atingiram uma temperatura de aproximadamente 180°C num período de 72 minutos a partir das 4:00 da manhã em soluções de phs ALTO e BAIXO.

- A continuidade do processo foi feita com uso de todo o kit envision flex da Dako para a realização da reação imuno-histoquímica, juntamente com uso de anticorpos concentrados (a serem diluídos) e *flex* (já diluídos) de acordo com seus respectivos phs.

- Foram abertas as tampas do PT-Link e deixado esfriar por 30 minutos para que não ocorresse choque térmico nas lâminas.

- Retirados os carrinhos do PT-Link.

- Mergulhado 10 vezes em solução tampão e deixado descansar por 5 minutos.

- Trocado o tampão, repetido o procedimento e deixado mais 5 minutos em descanso;

- Retirados os carrinhos com as lâminas da solução, tirado dos carrinhos uma a uma, secado nos arredores do fragmento com campo cirúrgico, fazendo um círculo com a caneta hidrofóbica ao redor do fragmento delimitando-o, e distribuindo as mesmas nas caixas acrílicas lado a lado. Em seguida pipetou-se 100µl de solução de bloqueio da peroxidase e deixado por 5 minutos em descanso;

- Em seguida lavou-se com solução tampão as lâminas e deixado também por 5 minutos em descanso;

- Retirado o excesso de solução tampão, levantando uma lâmina por vez, devolvendo-a na caixa novamente para pipetar o anticorpo primário já diluído, conforme designado nas lâminas previamente etiquetadas. O processo de incubação dos anticorpos seguiu as instruções abaixo:

4.4.3 Incubação com anticorpo primário

- Diluídos os anticorpos primários com diluente, de acordo com o título já padronizado, ou se já pré-diluído, utilizado diretamente.

- Enxugou-se as lâminas que estavam na água deionizada com campo cirúrgico ou papel toalha, tomando o cuidado de não estragar o fragmento.

- Delimitou-se a área do corte com caneta hidrofóbica.

- Pingou-se 100µl do anticorpo primário em cima do corte.

- Colocou-se as lâminas dentro de uma caixa de acrílico ou recipiente plástico, e incubamos por 30 minutos em temperatura ambiente.

- Lavou-se com tampão na própria cuba, utilizando pissete.
- Após a reação com os anticorpos primários, lavou-se novamente as lâminas nas caixas acrílicas com solução tampão e deixadas novamente em solução tampão por 5 minutos;
- Retirado o tampão levantando-se uma lâmina por vez, devolvendo-a na caixa novamente, pipetando o polímero HRP e deixando incubar por 20 minutos;
- Após, iniciou novamente em processo de lavagem com a solução tampão por 2 vezes e descansado 5 minutos em cada etapa;
- No caso de anticorpos (anti mouse ou anti rabbit) incubado o linker por 15 minutos e depois lavado com o tampão;
- Na próxima etapa iniciou-se o processo de revelação com o cromógeno Substrate Working Solution (equivalente ao DAB), onde pipetou-se 2 vezes e ficou em reação por 7 minutos em cada uma das vezes;
- Depois, lavadas as lâminas com solução tampão e colocadas em carrinhos que foram levados às cubas de hematoxilina por 30 segundos em descanso, e depois lavadas em água corrente;
- Em seguida, cada carrinho foi mergulhado na bateria de 4 cubas de álcool absoluto e 8 cubas de xilol, até serem trocadas de carrinhos e levadas à máquina de montagem de lâminas.

5 RESULTADOS

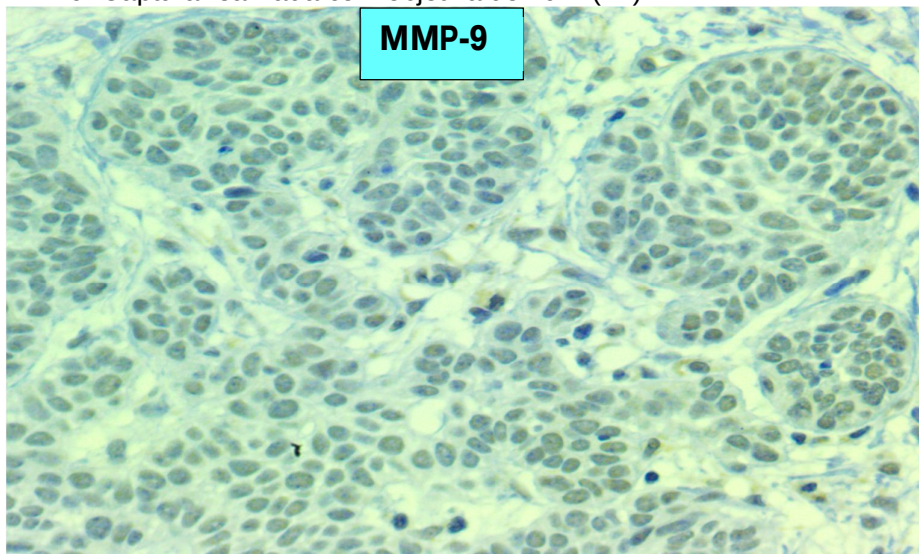
5.1 Análise da imunexpressão dos seis marcadores pesquisados

Os anticorpos primários utilizados (marcadores biológicos) foram: COX-2 (clone CX-294, DAKO), CXCR4 (clone ab124824, abcam), MMP-9 (clone ab76003, abcam) BerEP4 (clone Ber-EP4, DAKO), Bcl-2 (clone 124, DAKO), Ki-67 (clone MIB-1, DAKO). Todas as colorações foram analisadas independentemente ao microscópio óptico, marca Opticam modelo O500R trinocular com máquina fotográfica Opticam LOPT14003 acoplada, por dois patologistas que analisaram as lâminas segundo os seguintes critérios:

a) Na coloração de HE (Hematoxilina & Eosina), foi confirmado o subtipo histológico baseando-se nos critérios histológicos de Weedon (2010): grupo com subtipo nodular; grupo com subtipos micronodular e esclerodermiforme.

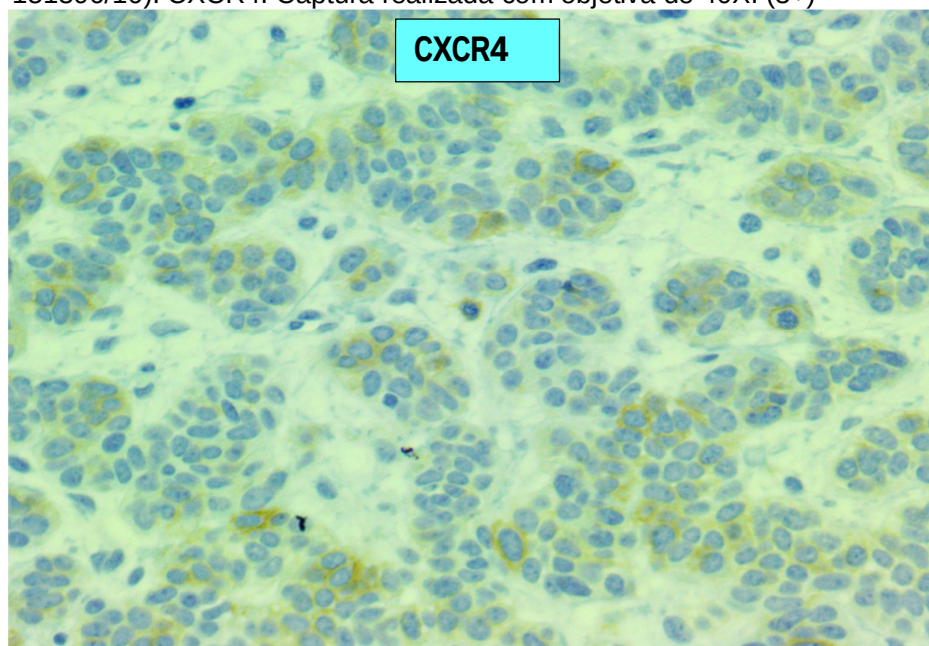
b) A avaliação da intensidade de expressão para os seis marcadores biológicos foi analisada considerando-se a imunopositividade citoplasmática e/ou nuclear, com a seguinte graduação: (0): negativo; (1+): pouco corada (expressão fraca em poucas células); (2+): moderada coloração (em menos da metade das células); (3+): fortemente corada (coloração intensa em metade ou mais das células). As informações das intensidades de expressão dos seis marcadores estão individualizadas na figura 27.

Figura 21: Fotomicrografia da imunomarcação do CBC (amostra 151396/16). MMP-9. Captura realizada com objetiva de 40X. (1+)



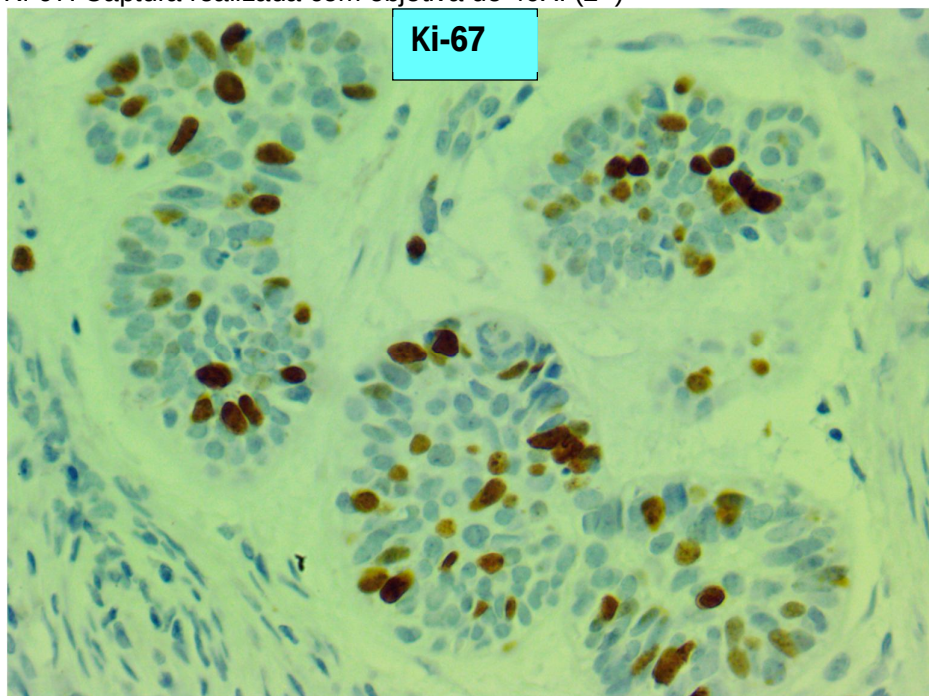
Amostra representativa do grupo

Figura 22: Fotomicrografia da imunomarcação do CBC (amostra 151396/16). CXCR4. Captura realizada com objetiva de 40X. (3+)



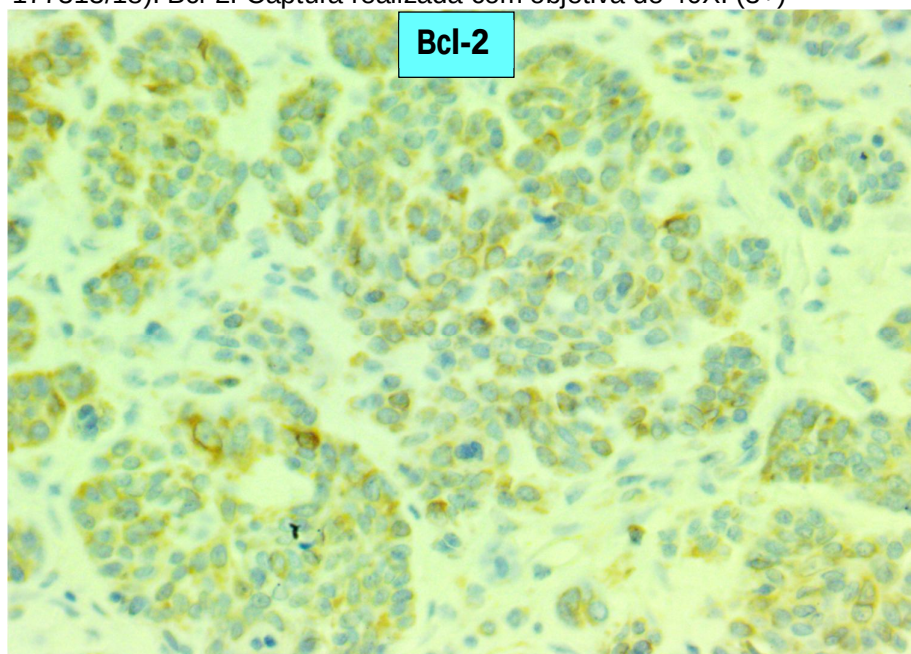
Amostra representativa do grupo

Figura 23: Fotomicrografia da imunomarcação do CBC (amostra 151396/16). Ki-67. Captura realizada com objetiva de 40X. (2+)



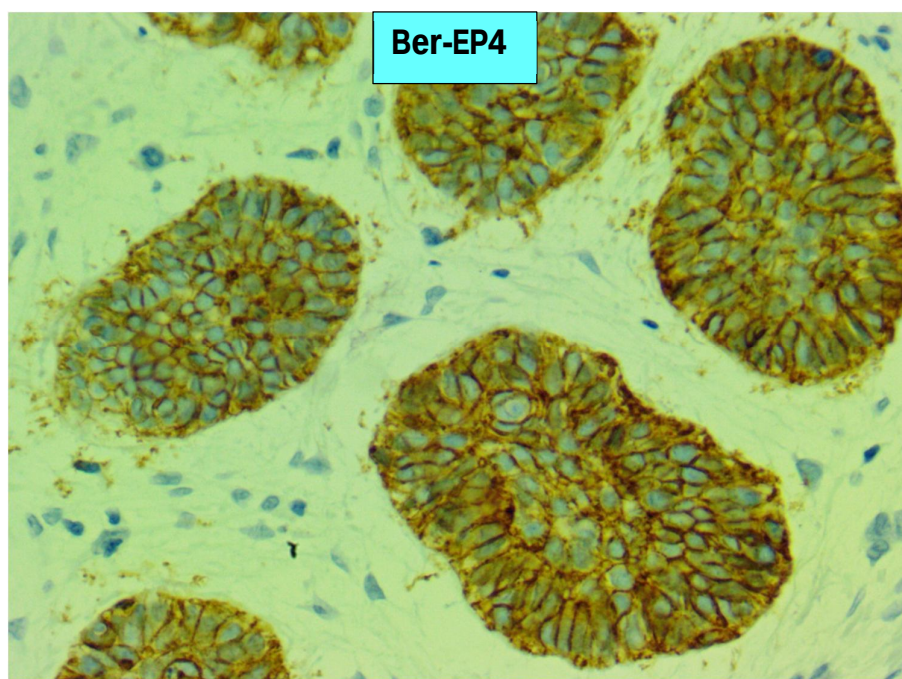
Amostra representativa do grupo

Figura 24: Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 177313/18). Bcl-2. Captura realizada com objetiva de 40X. (3+)



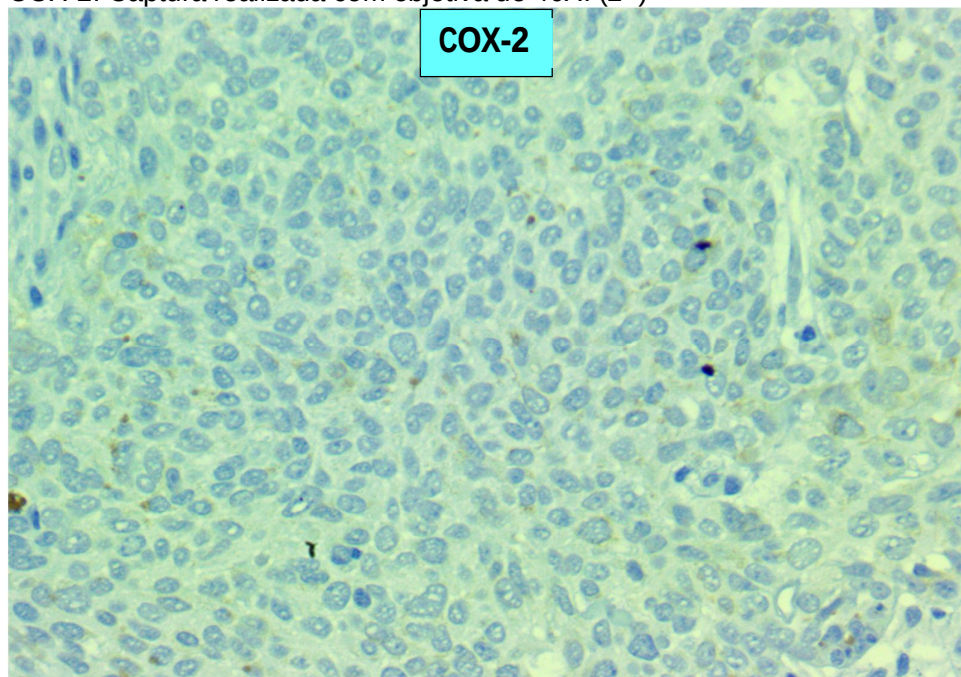
Amostra representativa do grupo

Figura 25: Fotomicrografia da imunomarcção do CBC (amostra 172345/17). Ber-EP4. Captura realizada com objetiva de 40X. (3+)



Amostra representativa do grupo

Figura 26: Fotomicrografia da imunomarcaco do CBC (amostra 172918/17). COX-2. Captura realizada com objetiva de 40X. (2+)



Amostra representativa do grupo

Figura 27: Quadro mostrando a imunoexpressão em cruzes dos biomarcadores utilizados e correspondência com os subtipos histológicos de baixo e alto risco de recorrência.

Número	Caso	MMP-9	CXCR-4	COX-2	BCL2	Ki-67	Ber EP4	HE (Diagnóstico)
1	152507/16 (A)	+	++	+	+++	++	+++	CBC Micronodular
2	150298/15	++	++	+	++	++	+++	CBC Micronodular
3	150308/15 (A)	+	++	+	+++	++	+++	CBC Micronodular
4	149611/15 (B)	++	+	+	++	++	+++	CBC Micronodular
5	172345/17 (A)	+	++	+	++	++	+++	CBC Micronodular
6	151396/16 (B)	+	+++	+	+	++	+++	CBC Micronodular
7	173177/17	++	++	+	+	++	+++	CBC Micronodular
8	177313/18	+	++	+	+++	++	+++	CBC Micronodular
9	179208/18	++	++	+	++	++	+++	CBC Micronodular
10	170326/17 (A)	+	+	++	++	++	+++	CBC Esclerodermiforme
11	163646/17	+	+	+	+	++	+++	CBC esclerodermiforme
12	159314/16	++	++	+	+	++	+++	CBC esclerodermiforme
13	154202/16 (A)	++	++	++	+	++	+++	CBC esclerodermiforme

14	145359/15	+	++	++	+	++	+++	CBC esclerodermiforme
15	142482/15	+	+	+	+	++	+++	CBC esclerodermiforme
16	142452/15	+	+	+	+	+	+++	CBC Nodular
17	142474/15 (A)	+	++	+	+++	+	+++	CBC Nodular
18	142481/15	+	+	+	+++	+	+++	CBC Nodular
19	145370/15	++	+	+	+	+	+	CBC Nodular
20	145364/15	++	+	++	+++	+	++	CBC Nodular
21	140954/15	+	+	+	+++	++	+++	CBC Nodular
22	141484/15	+	+	+	+	+	+++	CBC Nodular
23	141493/15 (B)	+	+	+	+++	+	+++	CBC Nodular
24	135119/15	+	+	+	+++	+	+++	CBC Nodular
25	142479/15	+	+	+	++	+	+++	CBC Nodular
26	142450/15	+	++	+	+++	+	+++	CBC Nodular
27	140943/15	+	+	+	++	+	+++	CBC Nodular

28	142277/15	++	+	+	++	+	+++	CBC Nodular
29	142460/15 (A)	+	+	+	++	+	+++	CBC Nodular
30	141182/15 (B)	+	+	+	+++	+	+++	CBC Nodular
31	141776/15	+	+	+	++	+	+++	CBC Nodular
32	140960/15	+	+	+	++	+	+++	CBC Nodular
33	142276/15	+	+++	++	++	+	+++	CBC Nodular
34	172873/17	+	+	++	+++	+	+++	CBC Nodular
35	172876/17	+	+	+	+++	+	+++	CBC Nodular
36	172919/17 (A)	+	+	+	+++	+	+++	CBC Nodular
37	172926/17 (B)	+	+	+	+	+	+++	CBC Nodular
38	172059/17 (A)	+	+	++	++	+	+++	CBC Nodular
39	172888/17	+	+	++	++	+	+++	CBC Nodular
40	172918/17 (A)	++	+	++	+++	+	+++	CBC Nodular

Classificação da expressão IHQ: 0 = negativo + = fraco ++ = moderado +++ = intenso

Quanto à percentagem os casos foram classificados em: negativo = 0, + = 1-25%, ++ = 25-50%, +++ = 50-100% das células positivas

5.2 Análise estatística dos dados

A comparação entre pacientes com baixo e aqueles com alto risco de recorrência de carcinoma basocelular, em relação à intensidade de expressão dos marcadores MMP-9, CXCR-4, COX-2, Bcl-2, Ki-67 e Ber-EP4, na imunohistoquímica, foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney, uma vez que as amostras não passaram no teste de Shapiro-Wilk. Os demais resultados deste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabela e gráfico. A análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico SPSS, versão 23.0, considerando um nível de significância de 5% (ROWE,2007).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da intensidade de expressão dos marcadores na imuno-histoquímica (0 a 3 cruzes), de acordo com o risco de recorrência de carcinoma basocelular (CBC). Estes mesmos resultados estão ilustrados na Figura 28.

Não houve diferença estatística significativa entre subtipos classificados como de baixo risco de recorrência de CBC e aqueles classificados como tendo alto risco, em relação à intensidade de expressão dos marcadores MMP-9 ($p=0,211$), COX-2 ($p=0,847$) e Ber EP4 ($p=0,679$).

A intensidade de expressão do marcador CXCR-4 nos subtipos classificados como de alto risco foi maior do que aquela observada nos subtipos de baixo risco ($p=0,001$). O mesmo foi observado em relação ao marcador Ki-67 ($p<0,001$). Por outro lado, a intensidade de expressão do marcador Bcl-2 nos subtipos classificados como de alto risco foi menor do que aquela observada nos subtipos de baixo risco ($p=0,038$), apesar de as medianas de intensidade de expressão do marcador para ambos os grupos terem sido as mesmas (duas cruzes). Esta diferença entre os grupos de pacientes pode ser melhor evidenciada na Figura 28.

Tabela 1: Resultados da intensidade de expressão dos marcadores na imuno-histoquímica (0 a 3 cruzes), de acordo com o risco de recorrência de carcinoma basocelular (CBC).

Marcador	Risco de recorrência de CBC		Valor de p
	Baixo risco (Mediana)	Alto risco (Mediana)	
MMP-9	1 (1 a 2)	1 (1 a 2)	0,211
CXCR-4	1 (1 a 3)	*2 (1 a 3)	0,001
COX-2	1 (1 a 2)	1 (1 a 2)	0,847
Bcl-2	*2 (1 a 3)	2 (1 a 3)	0,038
Ki 67	1 (1 a 2)	*2 (2 a 2)	<0,001
Ber EP4	3 (1 a 3)	3 (3 a 3)	0,679

Os resultados estão apresentados em mediana (mínimo a máximo). Valor de p no teste de Mann-Whitney. Valor de p em negrito indicam diferença entre baixo e alto risco de recorrência, em relação à expressão do marcador ($p < 0,05$).

* Significativamente maior.

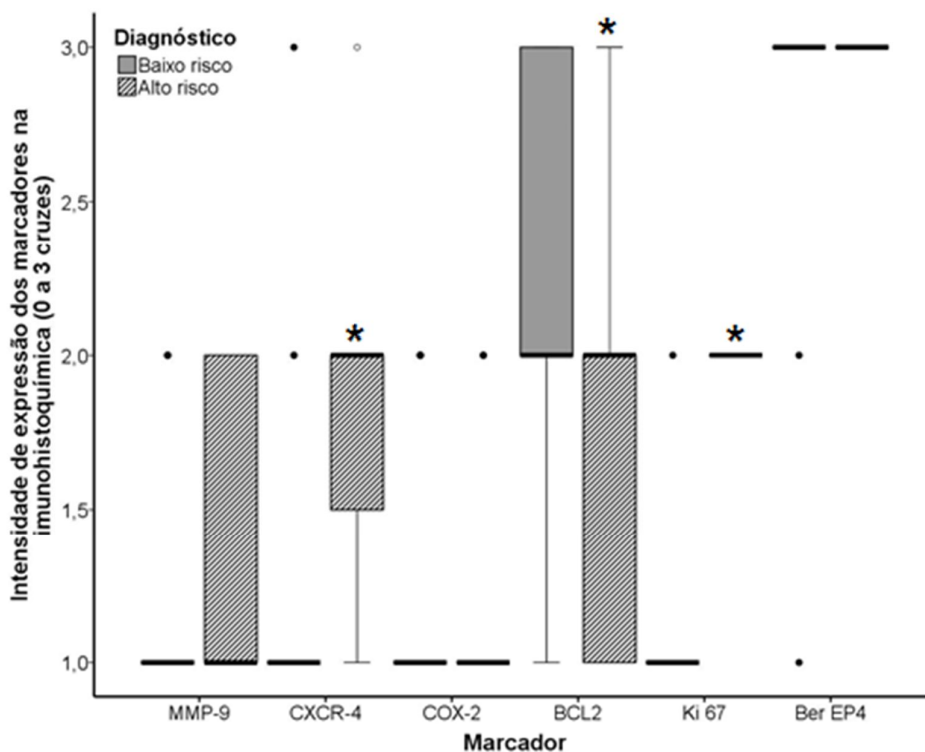


Figura 28: Gráfico *box plot* apresentando a intensidade de expressão dos marcadores na imuno-histoquímica (0 a 3 cruzes) em células de pacientes de baixo e alto risco de recorrência de carcinoma basocelular (CBC). A linha horizontal em negrito representa a mediana, a caixa representa o intervalo interquartil (25 e 75%), as barras representam o intervalo entre valor adjacente inferior e o valor adjacente superior e os círculos representam valores discrepantes (*outliers*). * Diferença significativa em relação aos pacientes com carcinoma basocelular de baixo risco (teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

5.3 Discussão

Em relação a intensidade de expressão do marcador inflamatório COX-2, verificou-se em nossos casos que não houve diferença significativa entre a imunopositividade dos espécimes de baixo e alto risco de recorrência, pois a imunoexpressão em cruces na maioria dos casos foi de fraca a moderada ($p=0,847$). No estudo de Karahan. *et al.* (2011), verificou-se, no entanto, que a expressão de COX-2 foi significativamente mais alta nos subtipos de CBC de padrão infiltrativo, comparado com os subtipos nodular e superficial. Neste estudo os autores sugerem que a expressão de COX-2 pode estar associada com a agressividade local e risco de recorrência nos CBCs.

El-Khalawany e Abou-bakr (2013), estudando a expressão de COX-2 através de imuno-histoquímica em casos de carcinoma basocelular recorrente, verificaram que houve expressão em 90,9% dos casos recorrentes comparado a 59,1% dos casos de CBC não recorrente com uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$). Relataram ainda que houve expressão moderada a intensa em 13 casos de tumor recorrente e 2 não recorrentes. Concluiu-se que altas expressões de COX-2 podem ser consideradas fatores de risco de recorrência de CBC junto com outros fatores clínicos e histológicos.

Chaudhary *et al.* (2017) usando modelo animal de rato com tumorigênese de pele induzida por UVB observaram que o naproxeno (um inibidor de COX-2) inibiu significativamente tanto o CBC como o CEC. A inibição foi observada no número e no volume de lesões e as principais reduções foram nos tumores do tipo CBC. Os efeitos estavam associados com decréscimo na expressão de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e Ciclina D1, aumento de apoptose e de moléculas relacionadas a inflamação (e.g., iNOS, COX-2, NF-kB e p65). Mesmo tumores residuais, após terapia com naproxeno, apresentaram um potencial agressivo mais baixo, expressão reduzida de marcadores de EMT (*Epithelial-mesenchymal transition*), como por exemplo a N-caderina, Vimentina, Snail e Twist e expressão aumentada de E-caderina.

As quimiocinas e seus receptores são bem conhecidas por sua habilidade em atrair leucócitos e também por desempenhar papel importante na progressão tumoral. Em um estudo investigou-se o envolvimento de receptores de quimiocinas na patogênese do carcinoma basocelular cutâneo. Utilizando técnicas de biologia molecular verificaram que a CXCR4 estava mais expresso em CBCs nodulares ulcerativos e nos subtipos esclerodermiformes e menos expresso em CBCs do tipo superficial, indicando que a expressão de CXCR4 pode estar correlacionada com uma natureza mais agressiva em certos subtipos de CBC. Outro dado do estudo indicou que a expressão do CXCR4 pelas células tumorais pode atuar diretamente na neovascularização tumoral. Suportando isso, eles verificaram que a sinalização CXCR4/CXCL12 melhora a expressão de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Fator*) pelas células tumorais, isto implica que as células tumorais podem estar ativamente envolvidas na angiogênese VEGF dependente. Resumindo, os autores sugerem que o CXCR4 é expresso num subgrupo de células humanas de CBC, particularmente em variantes de natureza mais agressiva. A expressão aumentada de CXCR4 melhora a proliferação, resistência à apoptose, migração e angiogênese das células do CBC *in vitro* e, mais importante, tumorigênese *in vivo* do CBC, podendo servir como potencial estratégia terapêutica em certos tipos de CBC com natureza mais agressiva. Em nosso estudo, verificou-se que a intensidade de expressão do marcador CXCR-4 nos pacientes classificados como de alto risco foi maior do que aquela observada nos pacientes de baixo risco ($p=0,001$), corroborando os dados de Chen *et al.* (2006).

Em outro estudo, Ciurea *et al.* (2013), investigaram a expressão de CXCR4, MMP-13 e β -catenina em diferentes subtipos histológicos de CBC da face, e verificaram que a expressão imuno-histoquímica mais alta foi no subtipo metatípico, também conhecido como subtipo adenoescamoso. As expressões menores de CXCR4 foi relatada no subtipo micronodular e superficial. Em nosso estudo, as maiores intensidades de expressões de CXCR4 foram nos pacientes com subtipo de alto risco ($p=0,001$), que incluía 9 pacientes com CBC micronodular e 6 pacientes com subtipo esclerodermiforme. As menores expressões foram observadas em pacientes com subtipo nodular.

Xu *et al.* (2014), estudando 80 casos de CBC primário cutâneo verificaram que em 70% dos casos houve imunoexpressão positiva de CXCR4. Nesse estudo a

expressão aumentada de CXCR4 estava significativamente associada com o tamanho do tumor (>2 vs <2 cm, $p=0,002$) e com tipo patológico de crescimento (invasivo vs não-invasivo, $p=0,007$). Em conclusão, esse estudo revelou que o CXCR4 estava associado com progressão e invasão em pacientes com CBC, podendo ser considerado biomarcador de invasividade em CBCs da região nasal.

Sivrikoz *et al.* (2015), também estudaram a expressão de CXCR4 e COX2 em carcinomas basocelulares e carcinomas espinocelulares de pele bem diferenciados e sua relação com a invasibilidade e subtipos histológicos, e também verificaram que as maiores expressões dos dois marcadores eram maiores de acordo com a profundidade da infiltração tumoral. A expressão aumentada de ambos os marcadores foi observada nos subtipos infiltrativo, entre os quais o subtipo micronodular. Assim, concluíram que ambos os marcadores são bons parâmetros de agressividade tumoral, podendo ser objeto de terapias alvo-específicas. Este estudo também corrobora nossos achados, que mostraram maior intensidade de expressão do CXCR4 nos subtipos de maior risco (micronodular e esclerodermiforme).

Salan *et al.* (2018), em estudo sobre valor prognóstico de CXCR4, α -SMA (*Alpha-Smooth Muscle Actin*) e WASL (*Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) em carcinomas basocelulares de lábio superior utilizaram 24 espécimes de carcinoma basocelular de lábio superior subclassificando-os histopatologicamente nas seguintes variedades: superficial, nodular, micronodular, adenoide cístico, queratótico, esclerodermiforme e misto, e utilizaram os 3 marcadores através da imuno-histoquímica. Verificaram que em todos os casos invasivos, independente do subtipo histológico havia uma reatividade aumentada para esses 3 marcadores nas células tumorais e estromais, principalmente na interface estroma parênquima, e os achados mais intensamente positivos foram para os subtipos micronodular e esclerodermiforme, confirmando o comportamento biológico mais agressivo desses subtipos em relação aos demais subtipos.

Esses resultados também mostram o valor prognóstico do painel CXCR4 / α -SMA / WASL em acessar o comportamento biológico de CBCs de lábio superior. Em conclusão, este estudo também confirma nossos achados de maior intensidade de expressão do CXCR4 ($p=0,001$) nos subtipos de alto risco (CBC micronodular e CBC esclerodermiforme) (SALAN *et al.*, 2018).

Em relação ao CBC cutâneo Monhian *et al.* (2005) utilizaram MMP-1 e MMP-9 para verificar a imunoexpressão dessas enzimas em pele histologicamente normal imediatamente adjacente aos CBCs (tecido peritumoral) após cirurgia micrográfica de Mohs, e também em pele normal obtida da região retroauricular em 17 pacientes. Verificaram que expressões elevadas de MMP-1 e MMP-9 estavam consistentemente presentes no tecido peritumoral comparado com a pele de sítios a distância (pele retroauricular).

Em outra pesquisa, Ribeiro *et al.* (2008) estudaram a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e 9) e seus inibidores teciduais (TIMPs - *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) através de estudo imuno-histoquímico em 31 casos de CBC. Retrospectivamente foram obtidos dados como idade, sexo e tamanho da lesão. Observou-se correlação significativa entre idade e tamanho da lesão ($R=0,532$; $p=0,008$). Não foram observadas correlações significativas entre as outras variáveis e a expressão imuno-histoquímica dos antígenos de interesse.

Os autores concluíram que a expressão das metaloproteinases e seus inibidores teciduais não parece ser influenciada pelos parâmetros investigados e que haveria necessidade de estudos adicionais para melhor compreensão de sua associação com o comportamento biológico do CBC. Nesse estudo houve marcação de forte intensidade mais frequente na epiderme do que na neoplasia para todos os antígenos investigados (MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2). Entretanto, em nosso estudo não houve diferença significativa entre pacientes classificados como tendo baixo risco de recorrência de CBC e aqueles classificados como tendo alto risco, em relação à intensidade de expressão do marcador MMP-9 ($p=0,211$).

As metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), são enzimas da família das gelatinases, e seus inibidores tem um importante papel na progressão dos CBCs (CHEN *et al.*, 2007; HERNANDEZ-PEREZ *et al.*, 2012; MONHIAN *et al.*, 2005). Devido a degradação do colágeno tipo IV pelas metaloproteinases, as células cancerosas podem migrar fora do tumor e formar metástases distantes (ROH *et al.*, 2012). A MMP-9 tem um papel importante nesse processo pois atua como promotor da invasão tumoral (KERKELA, SAARIALHO-KERE, 2003; POSWAR *et al.*, 2013). Um aumento na expressão de MMP-9 foi observado em correlação com estágios clínicos e fenótipos mais agressivos deste câncer (EL-KHALAWANY, ABOU-BAKR, 2013; ZLATAROVA *et al.*, 2012). Além disso, o MMP-9 exerce importante papel no

processo de neoangiogênese, sendo envolvido na proliferação de células endoteliais e na ativação de fatores pró-angiogênicos (MONHIAN *et al.*, 2005; EL-KHALAWANY, ABOU-BAKR, 2013; ZLATAROVA *et al.*, 2012; CHANG, WERB, 2001; LUKASZEWICZ-ZAJAC, MROCZKO, SZMITKOWSKI, 2009).

Esses achados são consistentes com os dados publicados por Zlatarova *et al.* (2012), El-Khalawany e Abou-Bakr (2013) e Vanjaka-Rogosic *et al.* (2014).

Varani *et al.* (2000), mostraram que enquanto a maioria dos tecidos cancerosos expressam formas ativas de MMP-2 e MMP-9, as formas latentes dessas enzimas podem ser encontradas predominantemente nos tecidos normais.

De acordo com Orimoto *et al.* (2008), MMP-2 é um marcador de alta acurácia para distinguir entre CBCs e os tecidos normais circundantes. Em contraste, Chen, Lu e Wu, (2006), demonstraram a inibição de expressão de MMP-2 em CBC e colocaram uma dúvida diagnóstica em relação a esse marcador. Essas discrepâncias substanciais merecem pesquisas futuras para resolver esta questão.

Outro dos marcadores utilizados em nosso estudo foi o Bcl-2. A proteína Bcl-2 tem mostrado que suprime a morte celular e protege as células contra a apoptose. Na investigação conduzida por Puizina-Ivic *et al.* (2008) em variantes histopatológicas dos tumores malignos cutâneos mais comuns - carcinoma basocelular (CBC), carcinoma espinocelular (CEC), bem como lesões pré cancerosas como a queratose actínica (QA) e em tumor benigno como a queratose seborreica (QS), estudando a expressão de Bcl-2 imuno-histoquimicamente, verificou que em relação ao carcinoma basocelular as variantes nodular sólida, adenóide e cística exibiram imunopositividade mais intensa do que a variante esclerodermiforme. De fato, a variante esclerodermiforme demonstrou expressão reduzida de Bcl-2. Em nosso estudo a intensidade de expressão do marcador Bcl-2 nos pacientes classificados como de alto risco foi menor do que aquela observada nos pacientes de baixo risco ($p=0,038$). A expressão de Bcl-2 nos subtipos esclerodermiforme e micronodular (alto risco) foi menor do que no subtipo de baixo risco, visto que nas variantes de alto risco há uma proliferação celular aumentada, e na prática, essas formas tendem a recorrer muito mais e são mais difíceis de erradicar.

Em outro estudo, Sivrikoz e Guilsen (2015), utilizando ciclina D1 e Bcl-2 como marcadores imuno-histoquímicos em carcinomas basocelulares e basoescamosos

verificaram que houve uma diferença estatisticamente significativa entre as formas não agressivas (subtipo nodular) e agressivas (subtipos micronodular, infiltrativo e basoescamoso) para estes marcadores ($p < 0,005$). A ciclina D1 foi maior no grupo agressivo e o Bcl-2 foi menor no grupo agressivo comparado ao grupo não agressivo. Nesta investigação, os autores concluem que a ciclina D1 aumentada e o Bcl-2 reduzido se correlacionaram com subtipos de tumores agressivos e estes achados podem ser utilizados como marcadores preditivos de crescimento agressivo tanto em CBCs quanto em carcinomas basoescamosos. O nosso trabalho também demonstrou expressão menor de Bcl-2 nos casos de alto risco (micronodular e esclerodermiforme) ($p = 0,038$).

Outros autores que corroboram nossos achados são Staibano *et al.* (2001), Crowson *et al.* (1996) e Ramdial *et al.* (2000), que mostraram maiores índices de proteínas Bcl-2 em CBCs considerados indolentes. Atualmente o Bcl-2 pode ser utilizado no estudo imuno-histoquímico de CBCs como marcador diagnóstico conjuntamente com outros marcadores confirmatórios de histogênese da neoplasia como o Ber-EP4 (HOANG, 2017; PRIETO, 2019).

No nosso estudo comparamos ainda a intensidade de expressão do marcador de proliferação Ki-67 em indivíduos portadores de carcinoma basocelular com subtipo histológico de baixo risco e de alto risco de recorrência.

A marcação de Ki-67 foi moderadamente expressa nos CBCs micronodulares e esclerodermiformes e fracamente expressa nos CBCs nodulares, significando que nos pacientes classificados como alto risco foi maior que nos de baixo risco de recorrência ($p < 0,001$). Em outro estudo, Kramer *et al.* (2014) avaliaram a expressão de Ki-67 nas variantes histológicas de CBCs e nas recidivas, e não encontraram correlação estatisticamente significativa ($p = 0,617$). Essa condição de instabilidade tem sido reconhecida por autores que estudaram esse marcador em tumores de mesma natureza, como Corrêa *et al.* (2009), e que afirmam que o Ki-67 apresenta comportamento instável, uma vez que apresentou nível de significância baixo, entre 4 e 23%, tendo sido mais expresso nos subtipos nodular e superficial.

Já para Batinac *et al.* (2004), a expressão do Ki-67 revelou importante evidência de proliferação celular, quando comparado a expressão no carcinoma espinocelular (CEC) e queratose actínica (QA). Neste estudo, houve um padrão similar do Ki-67 e do p53, sugerindo uma associação entre a proliferação celular e a

expressão de p53. A expressão do Ki-67 e a não expressão de Bcl-2 no grupo carcinoma espinocelular, parece indicar que no CEC houve uma intensificação da atividade proliferativa. Mas, no que se referiu à QA, a maior expressão do p53, em relação a do Ki-67, possibilitou indicar a redução de apoptose nesse tipo de lesão, facilitando a perpetuação de células com dano no DNA não reparado.

No estudo de Dornelas *et al.* (2009), com relação ao marcador Ki-67, houve grande variedade na intensidade de marcação nas amostras de QA e CEC. Nossos resultados evidenciam que nos subtipos esclerodermiforme e micronodular, a fração proliferativa dos CBCs está aumentada. Isso alerta quanto ao comportamento mais infiltrativo nesses dois subgrupos. De fato, a taxa de recidiva cirúrgica em neoplasias infiltrativas, entre elas os subtipos esclerodermiforme e micronodular, pode ser reflexo da taxa de proliferação tumoral aumentada desses subgrupos.

Ber-EP4 é um anticorpo contra uma linhagem de células MCF-7 (linhagem celular de câncer de mama) e é direcionada contra glicoproteínas de 34 e 49 kDa presentes na superfície e no citoplasma de todas células epiteliais com exceção das camadas superficiais do epitélio escamoso, hepatócitos e células parietais. Embora ainda não esteja claro qual antígeno é reconhecido pelo anticorpo, uma ausência de reatividade à queratina tem sido encontrada em experimentos de *immunoblotting*. Uma reação positiva é vista em células epiteliais contendo grandes porções de antígenos de Ber-EP4, por exemplo, células epiteliais dos ductos biliares e células dos ductos do epidídimo. Em humanos o Ber-EP4 mostra um amplo espectro de reatividade com tecidos epiteliais humanos, desde um epitélio simples até camadas basais de epitélio escamoso não queratinizado e epiderme. Adicionalmente, a maioria dos casos de carcinoma demonstra imunorreatividade com este anticorpo. Os únicos adenocarcinomas que falham em reagir com este anticorpo são os de origem mamária e renais. O sarcoma sinovial bifásico mostra positividade para Ber-EP4 em 90% dos casos.

A expressão focal de Ber-EP4 em mesotélio do peritônio e no epitélio de superfície ovariana adjacente às lesões endometrióticas sugerem que o mesotélio adquira possivelmente características do epitélio nativo, o que suporta um processo de metaplasia do mesotélio peritoneal na patogênese da endometriose (CHETTY, COOPER, GOWN, 2016). Especificamente em relação a distinção entre carcinoma basocelular (CBC), carcinoma de células escamosas (CEC) e carcinomas

basoescamosos da pele Beer, Shepherd, Theaker (2000), foram os primeiros a investigarem o valor da imuno-histoquímica em diferenciar com o painel de anticorpos Ber-EP4 e EMA os CBCs, CECs e carcinomas basoescamosos da pele.

Utilizando 39 casos de CBCs, identificaram que todos os carcinomas basocelulares se coraram positivamente para Ber-EP4, enquanto que nos carcinomas escamosos nenhum se corou. Nos carcinomas escamosos, 22 de 23 casos de CEC coraram positivamente para EMA e somente 1 de 13 carcinomas basoescamosos corou focalmente para EMA. Nesse estudo, verificou-se que o Ber-EP4 é um marcador de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de carcinoma basocelular da pele, fato este também observado por Tellechea *et al.* (1993), Rajabi *et al.* (2007) e Sunjaya, Sunjaya, Tan (2017). Em nosso estudo, observamos que todos os casos de carcinoma basocelular, independente do subtipo histológico ($p=0,679$), expressaram imunopositividade intensa (+++) para Ber-EP4, o que reforça os trabalhos publicados na literatura quanto ao poder de discriminação do Ber-EP4 para distinguir entre carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular (CEC) e basoescamoso. Na atualidade, esse marcador é muito utilizado nos laboratórios de dermatopatologia em painéis com outros marcadores para distinção dessas neoplasias quando pouco diferenciadas ou de histologia duvidosa.

5.4 Perspectivas

Este trabalho investigou de forma inédita a expressão de alguns marcadores de inflamação, de proliferação e de confirmação de histogênese em subtipos histológicos de carcinomas basocelulares, incluindo subtipos de alto e de baixo risco de recorrência (recidiva).

Os resultados sugerem que os subtipos de alto risco de recorrência apresentam um perfil com maior intensidade de expressão de marcadores de inflamação e de proliferação e menor expressão de marcador anti-apoptótico, alertando para o potencial invasivo desses subtipos e a importância de que o CBC seja efetivamente tratado na primeira abordagem cirúrgica.

Novos estudos com o método aplicado neste trabalho poderiam explicar o comportamento não usual de determinadas lesões, que apesar de classificadas como de baixo risco, na clínica apresentam muitas vezes recidivas frequentes.

6 CONCLUSÃO

A intensidade de expressão dos marcadores CXCR-4 e Ki-67 foi maior nos CBCs classificados como de alto risco do que aquela observada nos CBCs de baixo risco ($p=0,001$; $p<0,001$), respectivamente.

A intensidade de expressão do marcador Bcl-2 nos CBCs classificados como de alto risco foi menor do que aquela observada nos CBCs de baixo risco ($p=0,038$).

Não houve diferença estatística significativa entre CBCs classificados como de baixo risco de recorrência de CBC e aqueles classificados como de alto risco, em relação à intensidade de expressão dos marcadores MMP-9 ($p=0,211$), COX-2 ($p=0,847$) e Ber-EP4 ($p=0,679$).

7 REFERÊNCIAS

- ACHIWA, H.; YATABE, Y.; HIDA, T.; KUROISHI, T.; KOZAKI, K.; NAKAMURA, S.; OGAWA, M.; SUGIURA, T.; MITSUDOMI, T.; TAKAHASHI, T. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. **Clinical Cancer Research**, 1999. 5(5): 1001-1005.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. **Science**, 1998. 281: 1322-6.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia. 2009. 15(2): 425-430.
- BATINAC, T.; ZAMOLO, G.; JONJIC, N.; GRUBER, F.; PETROVECKI, M. p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. **Tumori**, 2004. 90:120-7.
- BAYKAN, H.; CIHAN, Y. B.; OZYURT, K. Roles of white blood cells and subtypes as inflammatory markers in skin cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2015. 16(6): 2303-2306.
- BEER, T. W.; SHEPHERD, P.; THEAKER, J. M. Ber-EP4 and epithelial membrane antigen aid distinction of basal cell, squamous cell and basosquamous carcinomas of the skin. **Histopathology**, 2000. 37: 218-223.
- BERNARD, P.; DUPUY, A.; SASCO, A.; BRUN, P.; DURU, G.; NICOLYANNIS, N.; GROB, J. J. Basal cell carcinomas and actinic keratoses seen in dermatological practice in France: a cross-sectional survey. **Dermatology**, 2008. 216(3): 194-199.
- BICHAKJIAN, C.K.; OLENCKI, T.; AASI, S.Z.; ALAM, M.; ANDERSEN, J.S.; BERG, D.; et al. Basal cell skin cancer, Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**. 2016. 14(5): 574-97.
- BRAUN, N.; PAPADOPOULOS, T.; MULLER-HERMELINK, H. K. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. **Virchows Archives B Cell Pathology Including Molecular Pathology**, 1988. 56: 25-33.
- BRIDGE, J. A.; LEE, J. C.; DAUD, A.; WELLS, J. W.; BLUESTONE, J. A. Cytokines, chemokines and other biomarkers of response of checkpoint inhibitor therapy in skin cancer. **Frontiers of. Medicine**, 2018. (5): 351.
- BUSAM, K. J. **Dermatopatologia. 2ª Edição; Rio de Janeiro: Elsevier**, 2018. p. 397-406.

CAMERON, M. C.; LEE, E.; HIBLER, B. P.; BAKER, C. A.; MORI, S.; CORDOVAL, M.; NEHAL, K. S.; ROSSI, A. M. Basal Cell Carcinoma: epidemiology, pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2019. 80(2): 303-317.

CARDOSO, A. E. O. Estudo clínico e de mutações no gene PTCH1 em pacientes portadores de carcinomas basocelulares múltiplos familiares não sindrômicos. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CASTILLO, J. M.; KNOL, A. C.; NGUYEN, J. A. M.; KHAMMARI, A.; SAINT-JEAN, M.; DRENO, B. Immunohistochemical markers of advanced basal cell carcinoma: CD56 is associated with a lack of response the vismodegib. **European Journal of Dermatology**, 2016. 26(5): 452-9.

CHAN, G.; BOYLE, J. O.; YANG, E. K.; ZHANG, F.; SACKS, P.; SHAH, J. P.; EDELSTEIN, D.; SOSLOW, R. A.; KOKI, A. T.; WOERNER, B. M.; MASFERRER, J. L.; DANNENBERG, A. J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Research**, 1999. 59(5): 991-994.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends in Cell Biology**, 2001. 11(11): S37-S43.

CHASTKOFISKY, M. I.; BIE, W.; BALL-KELL, S. M.; HE, Y. Y.; TYNER, A. L. Protein tyrosine kinase 6 regulates UVB-induced signaling and tumorigenesis in mouse skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, 2015. 135(1): 2492-2501.

CHAUDHARY, S. C.; WASEEM, M.; RANA, M.; XU, H.; KOPELOVICH, L.; ELMETS, C. A.; ATHAR, M. Naproxen inhibits UVB-induced basal cell and squamous cell carcinoma development in Ptch^{+/-}/Skh-1 hairless mice. **Photochemistry and Photobiology**, 2017. 93(4):1016-1024.

CHEN, G. S.; LU, M. P.; WU, M. T. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 by fibroblasts in co-cultures with keratinocytes, basal cell carcinoma and melanoma. **The Journal of Dermatology**, 2006. 33(9): 609-615.

CHEN, G. S.; YU, H. S.; LAN, C. C. E.; CHOW, K. C.; LIN, T. Y.; KOK, L. F.; LU, M. P.; LIU, C. H.; WU, M. T. CXC chemokine receptor CXCR4 expression enhances tumorigenesis and angiogenesis of basal cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, Oxford, 2006.154(5): 910-918.

CHEN, W.; FU, X.; GE, S.; SUN, T.; SHENG, Z. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue-derived inhibitors of metalloproteinase in fetal and adult skins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2007. 39(5): 997-1005.

CHETTY, R.; COOPER, K.; GOWN, A. M. **Leong's manual of diagnostic antibodies for immunohistology. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press**, 2016. p. 27.

CHIAACCHIO, N. D.; CUCE, L. C. Carcinoma basocelular: estudo comparativo dos três tipos histológicos mais frequentes em relação à proliferação celular. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 1997. 72(5): 427-431.

CHINEM, V. P.; MIOT, H. A. Epidemiologia do carcinoma basocelular. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2011. 86(2):292-305.

CIAZYNSKA, M.; BEDNARSLI, I. A.; WODZ, K.; KOLANO, P.; NARBUTT, J.; SOBJANEK, M.; WOZNIACKA, A.; LESIAK, A. Proteins involved in cutaneous basal cell carcinoma development. **Oncology Letters**, 2018. 16: 4064-4072.

CIUREA, M. E.; CERNAE, D.; GEORESCU, C. C.; COTOI, O. S.; PATRASCU, V.; PARVANESCU, H.; POPA, D.; PARVANESCU, V.; CIUREA, R. N.; MERCUT, R. Expression of CXCR4, MMP-13 and β -catenin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, 2013. 54(4): 939-951.

CORREA, M. P. D.; FERREIRA, A. P.; GOLLNER, A. M.; RODRIGUES, M. F.; GUERRA, M. C. S. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2009. 84(6): 606-614.

CROWSON, A. N. Basal Cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. **Modern Pathology**, 2006. 19, S127- S147.

DENKERT, C.; KOBEL, M.; BERGER, S.; SIEGERT, A.; LECLERE, A.; TREFZER, U.; HAUPTMANN, S. Expression of cyclooxygenase-2 in human malignant melanoma. **Cancer Research**, 2001. 61(1): 303-308.

DORNELAS, M. T.; RODRIGUES, M. F.; MACHADO, D. C.; GOLLNER, A. M.; FERREIRA, A. P. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e queratose actínica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2009. 84: 469-475.

Du MANOIR, M. S.; GUILLAUD, P.; CAMUS, E.; SEIGNEURINI, D.; BRUGAL, G. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. **Cytometry**, 1991. 12: 455-463.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases (review). **Natural Review Cancer**, London. 2002. 2(3): 161-174.

ELDER, D.E.; MASSI, D.; SCOLYER, R.A.; WILLEMZE, R. **WHO Classification of Skin Tumors**; 4th Edition; Lyon 2018: 26-34.

EL-KHALAWANY, M.; ABOU-BAKR, A. Role of cyclooxygenase-2, ezrin and matrix metalloproteinase-9 as predictive markers for recurrence of basal cell carcinoma. **Journal of Cancer Researches and Therapeutics**, Mumbai. 2013. 9(4): 613-617.

EPSTEIN, E. H. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. **Nature Reviews Cancer**, 2008. 8:743-754.

FERNANDES, J. V.; COBUCCI, R. N. O.; JATOBA, C. A. N.; FERNANDES, T. A. A. M.; AZEVEDO, J. W. V.; ARAUJO, J. M. G. The role of the mediators of inflammation in cancer development. **Pathology Oncology Research**, 2015. 21(3): 527-534.

GHITA, M. A.; CARUNTU, C.; ROSCA, A. E.; KALESCHI, H.; CARUNTU, A.; MORARU, L.; DOCEA, A. O.; ZURAC, S.; BODA, D.; NEAGU, M.; SPANDIDOS, D. A.; TSATSAKIS, A. M. Reflectance confocal microscopy and dermoscopy for in vivo, non-invasive skin imaging of superficial basal cell carcinoma. **Oncology Letters**, 2016. 11:3019-3024.

GODZIALSKA, A.; WOJAS-PELC, A.; DRAG, J.; BRZEWSKI, P.; JASKIEWICZ, J.; PASTUSZCZAK, M. Expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in basal cell carcinoma. **Molecular Biology Reports**, 2016. 43:1027-1033.

GRIVENNIKOV, S.; GRETEN, F.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, Cambridge. 2010. 140(6): 883-899.

HALF, E.; TANG, X. M.; GWYN, K.; SAHIN, A.; WATHEN, K.; SINICROPE, F. A. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. **Cancer Research**, 2002. 62(6): 1676-1681.

HASE, T.; YOSHIMURA, R.; MATSUYAMA, M.; KAWAHITO, Y.; WADAA, S.; TSUCHIDAA, H.; SANOB, T.; NAKATANI, T. Cyclooxygenase-1 and -2 in human testicular tumours. **European Journal of Cancer**, 2003. 39(14): 2043-9.

HEIDEBRECHT, H. J.; BUCK, F.; HASS, K.; WAKER, H. H.; PAWARESCH, R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the "Ki-67" proteins. **Cell Proliferation**, 1996. 29: 413-425.

HERNANDEZ-PEREZ, M.; EL-HAJAHMAD, M.; MASSARO, J.; MAHALINGAM, M. Expression of gelatinases (MMP-2, MMP-9), and gelatinase activator (MMP-14) in actinic keratosis and in in situ and invasive squamous cell carcinoma. **The American Journal of Dermatopathology**, 2012. 34(7): 723-728.

HLA, T.; NEILSON, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 1992. 89 (16): 7384-8.

HOANG, M. P. **Immunohistochemistry in diagnostic dermatopathology, 1th Edition**. New York, NY: Cambridge University Press; 2017.

HOSCH, S.; KRAUS, J.; SCHEUNEMANN, P.; IZBICK, J. R.; SCHNEIDER, C.; SCHUMACHER, U.; WITTER, K.; SPEICHER, M. R.; PANTEL, K. Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. **Cancer Research**, 2000. 60: 6836-6840.

HOSOMI, Y.; YOKOSE, T.; HIROSE, Y.; NAKAJIMA, R.; NAGAI, K.; NISHIWAKI, Y.; OCHIAI, A. Increased cyclooxygenase-2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. **Lung Cancer**, 2000. 30(2): 73-81.

ILLEMANN, M.; BIRD, N.; MAJEED, A.; SEHESTED, M.; LAERUM, O. D.; LUND, L. R.; DANØ, K.; NIELSEN, B. S. MMP-9 is differentially expressed in primary human colorectal adenocarcinomas and their metastases. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia. 2006. 4(5): 293-302.

INCA - Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva” (BR). Ministério da Saúde. **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018. doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2018v64n1.115

ISHI, L. A.; PEREIRA, I. C.; SCHELLINI, S. A.; MARQUES, M. E. A.; PADOVANI, C. R. Carcinoma basocelular de pálpebra – fatores relacionados com a recidiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2004. 79(4): 423-430.

JIA, J.; SHI, Y.; YAN, B.; XIAO, D.; LAI, W.; PAN, Y.; JIANG, Y.; CHEN, L.; MAO, C.; ZHOU, J.; XI, S.; YA, C. A. O.; LIU, S.; TAO, Y. Y. LGR5 expression is controlled by IKKα in basal cell carcinoma through activating STAT3 signaling pathway. **Oncotarget**, 2016. 7(19):27280 – 27294.

KARAHAN, N.; BASPINAR, S.; BOKURT, K. K.; IBRAHIM, M. C.; KAPUCUOGLU, N. Increased expression of COX-2 in recurrent basal cell carcinoma of the skin: A pilot study. **Indian Journal of Pathology Microbiology**, 2011. 54(3): 526-531.

KAUKINEN, A.; SIISKONEN, H.; PLKONEN, J.; HARVIMA, I. T. Immunoreactivity to CYP24A1, but not vitamin D receptor, is increased in mast cells of keratinocyte skin cancers. **European Journal of Dermatology**, 2017. 27(6): 590-598.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Experimental Dermatology**, 2003. 12(2): 109-125.

KILL, I. R. Localization of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. **Journal of Cell Science**, 1996. 109: 1253-1263.

KIM, D. P.; KUS, K. J. B.; RUIZ, E. Basal Cell Carcinoma Review. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, 33. 2019. 13-24.

KIRSCHENBAUM, A.; KLAUSNER, A. P.; LEE, R.; UNGER, P.; YAO, S.; LIU, X. H.; LEVINE, A. C. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. **Urology**, 2000. 56(4): 671-6.

KRAMER, E.; HERMAN, O.; FRAND, J.; LEIBOU, L.; SHREIDER, L.; VAKTINE, H. Ki-67 as biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study. **The Israel Medical Association Journal**, 2014. 16: 229-232.

KUSENDA, J. Bcl-2 family proteins and leukaemia [minireview]. **Neoplasm**, 1998. 45: 117-122.

KUZNETSOVA, E. V.; SNARSKAYA, E. S.; ZAVALISHINA, L. E.; TKACHENKO, S. B. Immunohistochemical study of the specific features of expression of matrix

metalloproteinases 1, 9 in the photoaged skin, the foci of actinic keratosis and basal cell carcinoma. **Arkhiv Patologii**, 2016. 78(6): 17-22.

LARSIMONT, J. C.; YOUSSEF, K. K.; SANCHEZ-DANES, A.; SUKUMARAN, V.; DEFANCE, M.; DELATTE, B.; LIAGRE, M.; BAATSEN, P.; MARINE, J. C.; LIPPENS, S.; GUERIN, C.; DEL MARMOL, V.; VANDERWINDEN, J-M.; FUKS, F.; BLANPAIN, C. Sox9 controls self-renewal of oncogene targeted cells and links tumor initiation and invasion. **Cell Stem Cell**, 2015. 17(1): 60-73.

LATZA, U.; NIEDOBITEK, G.; SHWARTING, R.; NEKARDA, H.; STEIN, H. Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. **Journal of Clinical Pathology**, 1990. 43: 213-9.

LIM, H. Y.; JOO, H. J.; CHOI, J. H.; YI, J. W.; YANG, M. S.; CHO, D. Y.; KIM, H. S.; NAM, D. K.; LEE, K. B.; KIM, H. C. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in human gastric carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 2000. 6(2): 519-525.

LIMA, J. S. B.; MIOLA, A. C.; MARQUES, M. E. A.; MIOT, H. A. Patterns of proliferation and apoptosis in the different subtypes of basal cell carcinoma adjacent epidermis and recurrent forms. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2019. 94(1): 108-10.

LIN, Y.; CHAHAL, H. S.; WU, W.; CHO, H. G.; RANSOHOFF, K. J.; DAI, H.; TANG, J. Y.; SARIN, K. Y.; HAN, J. Association between genetic variation within vitamin D receptor-DNA binding sites and risk of basal cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, 2017. 140(9): 2085-2091.

LUKASZEWICZ-ZAJAC, M.; MROCZO, B.; SZMITKOWSKI, M. The significance of metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. **Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej (Online)**, 2009. 63: 258-265.

LUPI, O.; RIBEIRO, R. C.; HOFF, P. M. **Câncer Cutâneo. 1. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu**, 2019.

LUPU, M.; CARUNTU, A.; CARUNTU, C.; PAPAGHEORGHE, L. M. L.; ILIE, M. A.; VOICULESCU, V.; BODA, D.; CONSTANTIN, C.; TANASE, C.; SIFAKI, M.; DRAKOULIS, N.; MAMOULAKIS, C.; TZANAKAKIS, G.; NEAGU, M.; SPANDIDOS, D. A.; IZOTOV, B. N.; TSATSAKIS, A. M. Neuroendocrine factors: The missing link in non-melanoma skin cancer (Review). **Oncology Reports**, 2017. 38(3): 1327-1340.

MANTESE, S. A. O.; BERBERT, B. A. L. C. V.; GOMIDES, M. D. A.; ROCHA, A. Carcinoma Basocelular – Análise de 300 casos observados em Uberlândia – MG. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2006. 81:136-142.

MANTOVANI, A.; SAVINO, B.; LOCATI, M.; ZAMMATARO, L.; ALLAVENA, P.; BONECCHI, R. The chemokine system in cancer biology and therapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford. 2010. 21(1): 27-39.

MARU, G. B.; GANDHI, K.; RAMCHANDANI, A.; KUMAR, G. The role of inflammation in skin cancer. In: AGGARWAL, B. B, SUNG, B.; GUPTA, S. C.

Inflammation and Cancer. Advances in Experimental Medicine and Biology 816. Basel: Springer, 2014. cap.17, p. 437-469.

MARZUKA, A. G.; BOOK, S. E. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopatology and management. **Yale Journal of Biology and Medicine**, 2015. 88(2): 167-179.

MASFERRER, J. L.; LEAHY, K. M.; KOKI, A. T.; ZWEIFEL, B. S.; SETTLE, S. L.; WOERNER, B. M.; EDWARDS, D. A.; FLICKINGER, A. G.; MOORE, R. J.; SEIBERT, K. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. **Cancer Research**, 2000. 60(5): 1306-1311.

MOHAMMED, S. I.; KNAPP, D. W.; BOSTWICK, D. G.; FOSTER, R. S.; KHAN, K. N.; MASFERRER, J. L.; WOERNER, B. M.; SNYDER, P. W.; KOKI, A. T. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. **Cancer Research**, 1999. 59(22): 5647-5650.

MONHIAN, N.; JEWETT, B. S.; BAKER, S. R.; VARANI, J. Matrix Metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients. **Archives of Facial Plastic Surgery**, 2005. 7: 238-243.

MOMBURG, F., MOLDENHAUER, G., HAMMERLING, G. J., MOLLER, P. Immunohistochemical Study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. **Cancer Research**, 1987. 47: 2883-2891.

MONTAGNA, E.; LOPES, O. S. Bases moleculares do carcinoma basocelular. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2017. 92(4): 518-21.

MURANUSHI, C.; OLSEN, C. M.; GREEN, A. C.; PANDEYA, N. Can oral nonsteroidal anti-inflammatory drugs play a role in the prevention of basal cell carcinoma? A systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2016. 74(1): 108-119.

NASSER, N. Epidemiologia dos carcinomas basocelulares em Blumenau, SC, Brasil, de 1980 a 1999. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro. 2005. 80(4): 363-368.

NEAGU, M.; CONSTANTIN, C.; CARUNTU, C.; DUMITRU, C.; SURCEL, M.; ZURAC, S. Inflammation: A key process in skin tumorigenesis (Review). **Oncology Letters**, 17: 4068-4084, 2019.

NEVES, R. G.; TALHARI, S.; SOARES FILHO, P. J. Carcinoma Basocelular. In: NEVES, R. G.; LUPI, O.; TALHARI, S. **Câncer da Pele**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. cap.7, p. 109-133.

OCANHA, J. P.; DIAS, J. T.; MIOT, H. A.; STOLF, H. O.; MARQUES, M. E. A.; ABBADE, L. P. F. Recidivas e recorrências de carcinomas basocelulares da face. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2011. 86(2): 386-388.

OKAMI, J.; YAMAMOTO, H.; FUJIWARA, Y.; TSUJIE, M.; KONDO, M.; NOURA, S.; OSHIMA, S.; NAGANO, H.; DONO, K.; UMESHITA, K.; ISHIKAWA, O.; SAKON, M.; MATSURA, N.; NAKAMORI, S.; MONDEN, M. Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. **Clinical Cancer Research**, 1999. 5(8): 2018-2024.

OLIVEIRA, A. M. Expressão da quimiocina SDF-1 α (CXCL12) e seu respectivo receptor CXCR4 em células de pacientes com mieloma múltiplo e linhagem de células de mieloma múltiplo humano (rpmi-8226) após tratamento com talidomida. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ORIMOTO, A. M.; NETO, C. F.; PIMENTEL, E. R.; SANCHES, J. A.; SOTTO, M. N.; AKAISHI, E.; RUIZ, I. R. G. High numbers of human skin cancers express MMP2 and several integrin genes. **Journal of Cutaneous Pathology**, 2008. 35(3): 285-291.

PAPAKOSTAS, D.; STOCKFLETH, E. Topical treatment of basal cell carcinoma with the immune response modifier imiquimod. **Future Oncology**, 2015. 11(22): 2985-2990.

PITTAYAPRUEK, P.; JITLADA, M.; PRAPAPAN, O.; KOMINE, M.; OHTSUKI, M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016. 17, 868-888.

PLAVETIC, N. D.; JAKIC-RAZUMOVIC, J.; KULIC, H.; SIROTKOVIC-SKERLEV, M.; BARIC, M.; VEBANEC, D. Prognostic value of Ki-67 in breast carcinoma: tissue microarray method versus whole section analysis- potentials and pitfalls. **Pathology Oncology Research**, 2015. 21: 315-324.

POSWAR, F. O.; FRAGA, C. A. C.; GOMES, E. S. B.; FARIAS, L. C.; SOUZA, L. W. F.; SANTOS, S. H. S.; GOMEZ, R. S.; DE-PAULA, A. M. B.; GUIMARÃES, A. L. S. 4 Protein expression of MMP-2 and MTI-MMP in Actinic Keratosis, Squamous Cell Carcinoma of the skin, and Basal Cell Carcinoma. **International Journal of Surgical Pathology**, London. 2015. 23(1): 20-25.

PRASAD, S.; AGGARWAL, B. Inflammation. DeVita Jr, V. T.; Lawrence, T. S.; Rosenberg, S. A. Cancer: **Primer of the Molecular Biology of Cancer**. 2nd. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015. cap.5, p. 97-105.

PRIETO, V. G. Immunohistology of skin tumors. Dabbs, D. J. **Diagnostic Immunohistochemistry**. 5nd. Philadelphia: Elsevier; 2019. Cap.13. p. 479-508.

PUIZINA-IVIC, N.; SAPUNAR, D.; MARASOVIC, D.; MIRIC, L. An overview of Bcl-2 expression in histopathological variants of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, actinic keratosis and seborrheic keratosis. **Collegium Antropologicum**, 2008. 32(2): 61-65.

RAJABI, P.; MOHAMMAD, A.; HEIDARPOUR, M.; ASILIAN, A.; RAJABI, F. Evaluation of diagnostic values of EMA and Ber-EP4 in distinction between basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. **Iranian Journal of Pathology**, 2007. 2(1): 7-10.

RAMDIAL, P.K.; MADAREE, A.; REDDY, R.; CHETYY, R. Bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. **Journal of Cutaneous Pathology**, 2000. 27: 283-291.

RAMEZANI, M.; MOHAMADZAHARI, E.; KHAZAEI, S.; NAJAFI, F.; VAISI-RAYGANI, A.; RHBAR, M.; SADEGHI, M. Comparison of EMA, CEA, CD10 and Bcl-2 Biomarkers by Immunohistochemistry in Squamous Cell Carcinoma and basal cell carcinoma of the skin. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, 2016. 17 (3): 1379-1383.

RIBEIRO, P. L.; FILHO, J. B. S.; ABREU, K. D.; BREZINSKI, M. S.; PIGNATION, C. C. Você conhece esta síndrome? Síndrome de Gorlin-Goltz. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2016. 91 (4): 541-3.

RIBEIRO, R. I. M. A.; JUNIOR, P. C. B.; CARDOSO, S. V.; CANDELORI, I.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinoma basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2008. 44(2): 115-21.

RIVITTI, E. A. **Dermatologia de Sampaio e Rivitti**. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2018.

RIZZO, M. B. S.; LEPIQUE, A. P. Inflamação e Câncer. Saito, R. F *et al.* Ed. **Fundamentos de oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2015. cap. 15: 281-299.

ROH, M. R.; ZHENG, Z.; KIM, H. S.; KWON, J. E.; JEUNG, H. C.; RHA, S. Y. Differential expression patterns of MMPs and their role in the invasion of epithelial premalignant tumors and invasive cutaneous squamous cell carcinoma. **Experimental and Molecular Pathology**, 2012. 92(2): 236-242.

ROWE, P. **Essential Statistics for the pharmaceutical sciences**. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

RUBINA, K. A.; SYSOEVA, V. Y.; ZAORUJKO, E. I.; TSOKOLAEVA, Z. I.; KURDINA, M. I.; PARFYONOVA, Y. V.; TKACHUK, V. A. Increased expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in psoriatic skin and in basal cell carcinomas. **Archives of Dermatological Research**, 2017. 309(6): 433-442.

SALAN, A. I.; MARASECU, P. C.; CAMEN, A.; CUICA, E. M.; MATEI, M.; FLORESCU, A. M.; PADUREANU, V.; MARGARITESCU, C. The prognostic value of CXCR4, α -SMA and WASL in upper lip basal cell carcinomas. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, 2018. 59(3): 839-849.

SALMENKIVI, K.; HAGLUND, C.; RISTIMAKI, A.; AROLA, J.; HEIKKILA, P. Increased expression of cyclooxygenase-2 in malignant pheochromocytomas. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2001. 86(11): 56415-9.

SANO, H.; KAWAHITO, Y.; WILDER, R. L.; HASHIRAMOTO, A.; MUKAI, S.; ASAI, K.; KIMURA, S.; KATO, H.; KONDO, M.; HLA, T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. **Cancer Research**, 1995. 55(17): 3785-9.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, 2000. 182: 311-322.

SHEEHAN K. M.; SHEAHAN, K.; O'DONOGHUE, D. P.; MACSWEENEY, F.; CONROY, R. M.; FITZGERALD, D. J.; MURRAY, F. E. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer. **JAMA**, 1999. 282(13): 1254-17.

SHEIBANI, K.; SHI, S. S.; KEZIRIAN, J.; WEISS, L. M. Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, 1991. 15: 779-784.

SHIRAHAMA, T.; SAKAKURA, C. Overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the urinary bladder. **Clinical Cancer Research**, 2001. 7(3): 558-561.

SHONO, T.; TOFILON, P. J.; BRUNER, J. M.; OWOLABI, O.; LANG, F. F. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular regulations. **Cancer Research**, 2001. 61(1): 4375-4381.

SIVRIKOZ, O. N.; GUILSEN, K. The effects of cyclin D1 and Bcl-2 expression on aggressive behavior in basal cell and basosquamous carcinoma. **Iranian Journal of Pathology**, 2015. 10(3): 185-191.

SIVRIKOZ, O. N.; UYAR, B.; DAG, F.; TASLI, F.; SANAL, S. CXCR4 and COX-2 expression in basal cell carcinomas and well-differentiated squamous cell carcinomas of the skin: their relationship with tumor invasiveness and histological subtype. **Turk Patoloji Dergisi**, Istanbul. 2015. 31 (1):30-35.

SOUSA, R. B.; CUNHA, F. Q. Inflamação e Câncer. HOFF, P. M. G., Editor. **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu; 2013. v. 1. cap. 32, p. 431-446.

ST CLAIR, J. M.; BAR-SAGI, D. **The role of inflammation in cancer**. LaFond, R. E., Editor. *Cancer: the outlaw cell*. New York: Oxford University Press; 2012. cap. 12: 151-164.

STAIBANO, S.; MUZIO, L. L.; PANNONE, G.; SCALVENZI, M.; SALVATORE, G.; ERR, M. E. et al. Interaction between bcl-2 and p53 in neoplastic progression of basal cell carcinoma of the head and neck. **Anticancer Research**, 2001. 21(6):3757-3764.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases (review). **The Journal of Pathology**, Oxford. 2003. 200(4): 448-464.

STARBORG, M.; GELL, K.; BRUNDELL, E.; HOO, C. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for the cell cycle progression. **Journal of Cell Science**, 1996. 109: 143-153.

STRATTON, M. S.; ALBERTS, D. S. Current application of selective COX-2 inhibitors in cancer prevention and treatment. **Oncology**, 2002. 16 (5-4): 37-51.

SUNJAYA, A. P.; SUNJAYA, A. F.; TAN, S. T. The use of BERP4 immunohistochemistry staining for detection of basal cell carcinoma. **Journal of Skin cancer**, 2017. 1-10.

TAKITA, L. C.; GDLA, V.; LORO, L. S.; SANABRIA, B. D.; FREITAS, C. A. F.; ABREU, A. C.; SOBRINHO, C. A.; RAMALHO, R. T. Basal cell carcinoma in the labial filter: surgical treatment and reconstruction with bilateral perialar advancement flap in ascending. **International Journal for Innovation Education and Research**, 2019. 7(8): 402-406.

TAKITA, L. C.; SACHT, G. L. Carcinoma Basocelular. TAKITA, L. C.; SANGUEZA, M. A. **Patologia de Tumores Cutâneos**. Abordagem prática com correlações clínicas. São Paulo: Livraria Livromed Paulista; 2020.

TANG, J. Y.; AZTERBAUM, M.; ATHAR, M.; BARSANTI, F.; CAPPOLA, C.; ESTEVEZ, N.; HEBERT, J.; HWANG, J.; KIM, A.; LU, Y.; SO, P. L.; TANG, X.; KOHN, M. A.; McCULLOCH, C. E.; KOPELOVICH, L.; BICKERS, D. R.; EPSTEIN JR, E. H. Basal cell carcinoma chemoprevention with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in genetically predisposed PTCH1+/- humans. **Cancer Prevention Research**, 2010. 3(1): 25-34.

TAYLOR, C. R.; RUDBECK, L. **Immunohistochemical staining methods**. 6. Ed. Dako Denmark, 2013.

TELLECHEA, O.; REIS, J. P.; DOMINGUES, J. C.; BAPTISTA, A. P. Monoclonal antibody Ber-EP4 distinguishes basal cell carcinoma from squamous cell carcinoma of the skin. **The American Journal of Dermatopathology**, 1993. 15(5):452-455.

TILLEY, C.; DEEP, G.; AGARWAL, R. Chemopreventive Opportunities to Control Basal Cell Carcinoma: Current Perspectives. **Molecular Carcinogenesis**, 54; 688-697, 2015.

TUCKER, O. N.; DANNENBERG, A. J.; YANG, E. K.; ZHANG, F.; TENG, L.; DALY, J. M.; SOSLOW, R. A.; MASFERRER, J. L.; WOERNER, B. M.; KOKI, A. T.; FAHEY, T. J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. **Cancer Research**, 1999. 59(5): 987-990.

VAN DIERENDONCK, J. K.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C. J.; CORNELISSE, C. J. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. **Cancer Research**, 1989. 49: 2999-3006.

VANJAKA-ROGOSIC, L.; PUIZINA-IVIC, N.; MIRIC, L.; ROOSIC, V.; KUZMIC-PRUSAC, I.; BABIC, M. S.; VUKOVIĆ, D.; MARDEŠIĆ, S. Matrix metalloproteinases and E-cadherin immunoreactivity in different basal cell carcinoma histological types. **Acta Histochemica**, 2014. 116(5): 688-693.

VARANI, J.; HATTORI, Y.; CHI, Y.; SCHMIDT, T.; PERONE, P.; ZEIGLER, M. E.; et al. Collagenolytic and gelatinolytic matrix metalloproteinases and their inhibitors in basal cell carcinoma of skin: comparison with normal skin. **British Journal of Cancer**, 2000. 82(3): 657-665

VASEF, A. M.; AUERBACH, A. et al. **Diagnostic Pathology Molecular Oncology**. 2th Edition; Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. 776-779.

WANG, D.; DUBOIS, R. Eicosanoids and cancer. **Nature Review Cancer**, London. 2010. 10(3): 181-193.

WEEDON, D. **Weedon's Skin Pathology**. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2010. cap.31, p. 667-708.

WEIDENBUSCH, M.; RODLER, S.; SONG, S.; ROMOLI, S.; MARSCHNER, J. A.; KRAFT, F.; HOLDERIED, A.; KUMAR, S.; MULAY, S. R.; HONARPISHEH, M.; DEVARAPU, S. K.; LECH, M.; ANDERS, H-J. Gene expression profiling of the Notch-AhR-IL22 axis at homeostasis and in response to tissue injury. **Bioscience Report**, 37: BSR20170099, 2017.

XU, C. Z.; WANG, P. H.; YAN, X. J.; WANG, T.; CHEN, D.; ZHANG, Z. J.; SHI, R. J. Expression of CXCR4 is associated with progression and invasion in patients with nasal-surface basal cell carcinoma. **Journal for Otorhinolaryngology and its Related Specialties**, 2014. 75(6): 332-41.

YANG, E.; KORSMEYER, S. J. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death [review]. **Blood**, 1996. 88: 386-401.

ZHU, L.; KOHDA, F.; NAKAHARA, T.; CHIBA, T.; TSUJI, G.; HACHISUKA, J.; ITO, T.; TU, Y.; MOROI, Y.; UCHI, H. Aberrant expression of S100A16 and matrix metalloproteinase 9, but not S100A2, S100A4 and S100A7, is associated with epidermal carcinogenesis. **Journal of Dermatological Science**, 2013. 72(3): 311-319.

ZIMMERMANN, K. C.; SARBIA, M.; WEBER, A. A.; BORCHARD, F.; GABBERT, H. E.; SCHROR, K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. **Cancer Research**, 1999. 59(1): 198-204.

ZLATAROVA, Z. I.; SOFTOVA, E. B.; DOKOVA, K. G.; MESSMER, E. M. Expression of matrix metalloproteinases-1, -9, -13 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in basal cell carcinomas of the eyelid. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 2012 250(3): 425-431.

8 ANEXOS

Anexo 1. Quadro com as informações dos pacientes

Paciente	Gênero	Idade	Raça	Fototipo	Topografia	Diâmetro	Subtipo Histológico
B152507/16	M	64	Branca	1	Infra-escapular direita	1,3	CBC Micronodular
B150298/15	F	65	Branca	1	Parieto-occipital à esquerda	0,8	CBC Micronodular
B150308/15	F	57	Branca	1	Antebraço esquerdo	2,7	CBC Micronodular
B149611/15	F	82	Branca	2	Sulco naso-labial esquerdo	0,9	CBC Micronodular
B172345/17	F	62	Branca	2	Face	0,9	CBC Micronodular
B151396/16	F	59	Branca	1	Frontal esquerda inferior	0,9	CBC Micronodular
B173177/17	F	73	Branca	2	Asa nasal esquerda	0,6	CBC Micronodular
B177313/18	F	51	Branca	2	Ponta nasal	0,8	CBC Micronodular
B179208/18	M	58	Parda	2	Face	1,6	CBC Micronodular
B170326/17	M	78	Branca	2	Antebraço direito	1,9	CBC esclerodermiforme
B163646/17	F	75	Branca	1	Maxilar direito	0,8	CBC esclerodermiforme
B159314/16	F	65	Branca	2	Ponta nasal	1,4	CBC esclerodermiforme
B154202/16	F	62	Branca	2	Dorso nasal	1,4	CBC esclerodermiforme
B145359/15	F	51	Branca	1	Ponta nasal	1,3	CBC esclerodermiforme
B142482/15	M	53	Branca	2	Asa nasal esquerda	1,7	CBC esclerodermiforme
B142452/15	F	69	Branca	2	Cervical direita anterior	0,9	CBC nodular
B142474/15	F	44	Branca	2	Malar esquerda	0,4	CBC nodular
B142481/15	M	84	Branca	2	Zigomático esquerdo	1,5	CBC nodular
B145370/15	M	53	Branca	2	Antebraço esquerdo	1	CBC nodular
B145364/15	F	47	Branca	2	Asa nasal esquerda	1,8	CBC nodular

Paciente	Gênero	Idade	Raça	Fototipo	Topografia	Diâmetro	Subtipo Histológico
B140954/15	M	69	Branca	2	Fronte	1,6	CBC nodular
B141484/15	M	66	Branca	2	Asa nasal esquerda	0,8	CBC nodular
B141493/15	F	70	Branca	2	Sulco naso-labial direito	1,1	CBC nodular
B135119/15	F	58	Branca	1	Ponta nasal	1,1	CBC nodular
B142479/15	F	79	Branca	2	Dorso nasal direito	0,7	CBC nodular
B142450/15	F	78	Branca	1	Tórax anterior direito	1,3	CBC nodular
B140943/15	F	75	Branca	2	Cervical esquerda anterior	1,6	CBC nodular
B142277/15	M	78	Branca	2	Malar direita	0,6	CBC nodular
B142460/15	M	76	Branca	2	Mandibular esquerda	0,5	CBC nodular
B141182/15	M	75	Branca	2	Dorso nasal inferior	0,5	CBC nodular
B141776/15	M	71	Branca	2	Ponta nasal	1,5	CBC nodular
B140960/15	M	69	Branca	2	Asa nasal esquerda	0,7	CBC nodular
B142276/15	F	74	Branca	2	Asa nasal esquerda	0,7	CBC nodular
B172873/17	F	47	Branca	2	Asa nasal esquerda	0,5	CBC nodular
B172876/17	M	79	Branca	2	Malar esquerda	0,6	CBC nodular
B172919/17	M	55	Branca	2	Supra-clavicular direita	1,5	CBC nodular
B172926/17	M	66	Branca	2	Malar esquerda	0,5	CBC nodular
B172059/17	M	68	Branca	2	Nasal direita	0,8	CBC nodular
B172888/17	M	62	Branca	2	Clavicular esquerda	0,9	CBC nodular
B172918/17	M	66	Branca	2	Paranasal direita	0,7	CBC nodular

Anexo 2. Parecer do CEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE CICLOOXYGENASE-2 (COX-2), CXCR4 E METALOPROTEINASE DA MATRIZ-9 (MMP-9) EM SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DO CARCINOMA BASOCELULAR

Pesquisador: Luiz Carlos Takita

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57765716.7.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.669.979

Apresentação do Projeto:

O carcinoma basocelular (CBC) é um tumor epitelial maligno de origem epidérmica, derivado das células que se originam da camada basal da epiderme. É também denominado epitelioma basocelular. O carcinoma basocelular (CBC) é um tumor epitelial maligno de origem epidérmica, derivado das células que se originam da camada basal da epiderme. É também denominado epitelioma basocelular.

O CBC é o câncer mais comum em humanos e corresponde a aproximadamente 70% dos cânceres cutâneos não-melanoma (CCNM) nos Estados Unidos e no Canadá. Para explicar o comportamento biológico local agressivo e seu potencial metastático muitos estudos tem sido realizados para identificar os eventos moleculares implicados na progressão tumoral e sua associação com marcadores biológicos específicos, compondo parte da linha de pesquisa de pós-graduação em que está inserido o atual estudo. Com o objetivo de verificar e identificar possível associação entre marcadores biológicos empregados neste estudo e a neoplasia cutânea maligna mais comum no ser humano (carcinoma basocelular) e o comportamento desses marcadores COX-2, CXCR4 e a metaloproteinase da matriz-9 nas formas agressivas (subtipo esclerodermiforme e micronodular) empreenderemos esta investigação.

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549

CEP: 79.070-110

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.669.979

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

- Avaliar a expressão de ciclooxygenase-2 (COX-2), de CXCR4 e de metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) em subtipos histológicos do carcinoma basocelular.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a expressão de cada marcador biológico (COX-2, CXCR4 e MMP-9) em dois subgrupos de tipos histológicos de carcinomas basocelulares (nodular, esclerodermiforme e micronodular);
 - Verificar Imunohistoquimicamente o nível de infiltração neoplásica e a presença de expressão de cada marcador biológico (COX-2, CXCR4 e MMP-9) nos dois subgrupos de tipos histológicos de carcinomas basocelulares (nodular, esclerodermiforme e micronodular).

Correlacionar estatisticamente os resultados das imunocolorações na pele sã e nos dois subgrupos de tipos histológicos de carcinomas basocelulares (nodular, esclerodermiforme e micronodular).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador: "Os Riscos referentes a pesquisa são mínimos. A pesquisa será realizada com Banco de Amostras, mas fica garantido a sigilosidade do dados pelo Pesquisador. Esta pesquisa trará como benefício a utilização desses reagentes (COX-2, o CXCR4 e a metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9)) através de análise imuno-histoquímica em futuros aprimoramentos diagnósticos".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo de pesquisa atende integralmente as exigências éticas para pesquisas envolvendo seres humanos, conforme preconizado pela Resolução Nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa atende integralmente as exigências éticas para pesquisas envolvendo seres humanos, conforme preconizado pela Resolução Nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Foram apresentados:

- a folha de rosto, devidamente assinada.
- a autorização do local de realização da pesquisa;
- o termo de compromisso para uso de dados secundários;
- a declaração para uso de material biológico;

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS

Bairro: Caixa Postal 549

CEP: 79.070-110

UF: MS

Município: CAMPO GRANDE

Telefone: (67)3345-7187

Fax: (67)3345-7187

E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.669.979

- o TCLE, seguindo as exigências éticas da Res. 466/2012;
- o projeto de pesquisa com descrição de riscos e benefícios, critérios de inclusão e exclusão, orçamento e responsabilidade pelo financiamento da pesquisa, número de participantes e o local da pesquisa.

Recomendações:

No projeto anexado o cronograma de execução informa que a coleta de dados ocorrerá de junho a setembro. Solicita-se correção da previsão da coleta de dados para que ocorra somente após a aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP/UFMS, conforme consta no cronograma do projeto cadastrado na Plataforma Brasil (que prevê para setembro de 2016).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo de pesquisa atende integralmente as exigências éticas para pesquisas envolvendo seres humanos, conforme preconizado pela Resolução N° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Foram apresentados:

- a folha de rosto, devidamente assinada.
- a autorização do local de realização da pesquisa;
- o termo de compromisso para uso de dados secundários;
- a declaração para uso de material biológico;
- o TCLE, seguindo as exigências éticas da Res. 466/2012;
- o projeto de pesquisa com descrição de riscos e benefícios, critérios de inclusão e exclusão, orçamento e responsabilidade pelo financiamento da pesquisa, número de participantes e o local da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_732839.pdf	04/07/2016 15:01:48		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_tak.pdf	04/07/2016 15:01:08	Luiz Carlos Takita	Aceito
Outros	Banco_de_dados.pdf	09/06/2016 11:50:11	Luiz Carlos Takita	Aceito
Outros	Material_Biologico.pdf	09/06/2016 11:33:45	Luiz Carlos Takita	Aceito

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 1.669.979

Outros	Anuencia.jpg	09/06/2016 11:31:18	Luiz Carlos Takita	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	09/06/2016 11:30:10	Luiz Carlos Takita	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_2016.docx	09/06/2016 11:29:10	Luiz Carlos Takita	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 09 de Agosto de 2016

Assinado por:
PAULO ROBERTO HAIDAMUS DE OLIVEIRA BASTOS
 (Coordenador)

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br