**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

Dra. Andrezza Telles Westin

**Expressão de citocinas, linfócitos,
fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e
antígeno leucocitário humano G (HLA-G)
em carcinoma basocelular.**

**Ribeirão Preto
2014**

ANDREZZA TELLES WESTIN

**Expressão de citocinas, linfócitos, fator de crescimento
endotelial vascular (VEGF) e antígeno leucocitário
humano G (HLA-G) em carcinoma basocelular.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientadora:
Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza

**“Versão corrigida, a versão original encontra-se à
disposição na secretaria da CCP-CM.”**

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Westin, Andrezza Telles
Expressão de citocinas, linfócitos, fator de crescimento
endotelial vascular (VEGF) e antígeno leucocitário humano G
(HLA-G) em carcinoma basocelular. Ribeirão Preto, 2014.
157 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica.
Orientadora: Cacilda da Silva Souza.

1. Carcinoma Basocelular. 2. Citocinas. 3. Antígenos HLA-G.
4. Imunoistoquímica. 5. Reação em Cadeia da Polimerase em
Tempo Real

Westin AT. **Expressão de citocinas, linfócitos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e antígeno leucocitário humano G (HLA-G) em carcinoma basocelular.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza – FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Edson Garcia Soares – FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi – FMRP-USP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Mírian Nacagami Sotto – FMUSP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antônio Carlos Martins Guedes - UFMG

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A meus pais, Benedito Carlos e Therezinha, principais responsáveis pelo meu caráter e disciplina, que por uma vida de dedicação, amor incondicional e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar seus sonhos e suas conquistas.

A meu irmão Carlos Francisco e a todos da minha família, que me apoiaram e me estimularam desde que ingressei no doutorado até sua conclusão;

A meu esposo, Pedro, companheiro, amigo, amado, pela ajuda, força, estímulo e por me apaziguar nos momentos de ansiedade.

A Deus, pela fé, pelo amparo e pela proteção nesses anos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza, minha eterna gratidão por suas orientações, pelo seu apoio e incentivo, pela sua compreensão com minhas dificuldades e intercorrências no desenvolvimento dessa tese, permitindo alcançar mais esta conquista.

Ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares, por me acolher em seu laboratório, pela co-orientação, pelas contribuições científicas e intelectuais, além da oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pela co-orientação, por me permitir fazer parte de seu laboratório, tendo depositado confiança e incentivo para execução desse projeto.

À Ana Maria da Rocha, por me auxiliar em todo o processo de execução metodológica no Laboratório de Patologia, bem como pelos ensinamentos para essa tese.

À bióloga Cristiane Maria Milanezi pelo apoio no laboratório e pela paciência, dedicação e disposição em contribuir para o trabalho.

À Ana Maria Anselmi Dorigan, do laboratório de Patologia do HCRP, pela contribuição no desenvolvimento da técnica de imunoistoquímica, permitindo a realização desse projeto.

Ao estatístico Geraldo Cássio dos Reis, pelo auxílio na análise estatística dos resultados.

Aos residentes, médicos assistentes e colaboradores do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pelo auxílio prestado.

Aos funcionários do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pela colaboração constante.

Aos pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, que aceitaram participar desse estudo.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, agradeço o fornecimento de infraestrutura para realização do experimento.

Agradeço a todos aqueles que contribuíram nesse trabalho, sendo através da presença, do contato, da ajuda no dia-a-dia, principalmente do apoio emocional, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein (1879 -1955)

RESUMO

Westin AT. Expressão de citocinas, linfócitos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e antígeno leucocitário humano G (HLA-G) em carcinoma basocelular. [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014. 157 f.

Introdução: A elevada e crescente prevalência do carcinoma basocelular (CBC) na população caucasiana e o seu marcante predomínio entre os cânceres cutâneos não-melanoma despertam interesse para a elucidação dos mecanismos envolvidos no seu desenvolvimento. Os vários subtipos da neoplasia possuem características de interesse para um modelo de estudo, a fim de identificar os fatores determinantes dos diferentes padrões de crescimento. **Objetivo:** Neste estudo buscamos analisar, por meio da expressão de citocinas, linfócitos, VEGF e HLA-G, os possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos nos diferentes padrões de crescimento, subtipos e localizações topográficas do CBC. **Métodos:** Em 26 amostras de fragmentos dos subtipos nodular e superficial de CBC primários, foram analisadas a expressão de CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF, por meio de imunohistoquímica (IHQ), e de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-23, FOXP-3 e IFN-gama, por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR). **Resultados:** Na amostra (n=26), houve discreto predomínio de homens (54%), com idade variando entre 35 a 89 anos e média de 72,96 anos; 84,62% dos CBC eram localizados em área fotoexposta, 53,85% não-cefálicos (14/26) e 46,15% cefálicos (12/26). CBC nodulares apresentaram um infiltrado inflamatório mais evidente e concentrado ao redor dos blocos neoplásicos; CBC superficiais apresentaram um infiltrado inflamatório difuso por toda a derme, e discretamente mais intenso nas áreas adjacentes aos blocos tumorais. A expressão de todos os marcadores foi mais evidente no sítio perineoplásico (PN) comparado ao interior, das células neoplásicas (Cneo). Distintamente de outros marcadores, notou-se acentuada frequência da expressão de CD25⁺ e HLA-G nas Cneo. Nas Cneo dos CBCn, evidenciou-se elevada frequência de células marcadas em intensidade moderada para HLA-G (p=0,04) e em intensidade leve para FOXP3 (p = 0,037), quando comparados aos CBCs. A expressão de CD4⁺ no infiltrado PN foi mais frequente nos tumores não-cefálicos (p=0,02) comparados aos cefálicos. A expressão de citocinas IL-6, IL-8, IL-17 foi maior nos dois subtipos de CBC, nodular e superficial, comparada à da pele normal. CBC cefálicos apresentaram maior expressão de IL-4 (p=0,02), enquanto aqueles de localização não-cefálica expressaram mais IL-8 (p=0,002). **Conclusão:** A composição e a localização do infiltrado inflamatório corroboram a resposta imunológica mediada por células T CD3⁺ e CD4⁺ no CBC. A participação de linfócitos CD25⁺, FOXP3⁺ e do HLA-G caracteriza uma ação imunomoduladora, e a presença das interleucinas IL-8 e do perfil Th17, IL-6 e IL-17, podem favorecer a neovascularização e a supressão de células efectoras no microambiente do CBC propiciando o seu desenvolvimento e escape tumoral.

Palavras-chaves: Carcinoma Basocelular. Antígenos HLA-G. Citocinas. Imunohistoquímica. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

ABSTRACT

Westin AT. Expression of cytokines, lymphocytes, endothelial growth factor (VEGF) and human leukocyte antigen G (HLA-G) in basal cell carcinoma. [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014. 157 f.

Introduction: The high and increasing prevalence of basal cell carcinoma (BCC) in the Caucasian population, and its striking predominance between non-melanoma skin cancers arouse interest for the elucidation of the mechanisms involved in its development. Its various subtypes have characteristics of interest for a study model in order to identify the determinants of different patterns of growth. **Objective:** This study aims to analyze the possible immunomodulatory mechanisms involved in the different growth patterns, and topographic locations subtypes of BCC through the expression of cytokines, lymphocytes, VEGF and HLA-G. **Methods:** In 26 fragments samples of primary BCC, subtypes nodular and superficial, we analyzed the expression of CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G and VEGF by immunohistochemistry (IHC) technique, and of cytokines IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-23, FOXP-3 and IFN- γ by quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR). **Results:** The sample (n = 26) had a slight predominance of men (54%), aged between 35-89 years, mean age 72.96 years; 84.62% of the BCC were located in sun-exposed area, 53.85% (14/26) non-cephalic and 46.15% (12/26) cephalic. Nodular BCC showed a more evident and concentrated inflammatory infiltrate around the tumor blocks; while superficial BCC showed a diffuse inflammatory infiltrate throughout the dermis, and slightly more intense in tumor blocks adjacent areas. The expression of all markers was evident at the perineoplastic (PN) sites compared to neoplastic cells (Cneo). Differently from other markers, we noticed strong frequency expression of CD25⁺ and HLA-G within the Cneo. In Cneo of BCCn, it became apparent high frequency of moderate HLA-G marked cells (p = 0.04) and at low intensity for FOXP3 (p = 0.037) when compared to BCCs. The expression in CD4⁺ infiltrate was more frequent in PN non-cephalic tumors (p = 0.02) compared with cephalic. The expression of IL-6 IL-8, IL-17 was higher in both subtypes of BCC, nodular and superficial, compared to normal skin. Cephalic BCC showed higher expression of IL-4 (p=0,02) while those from non-cephalic location expressed more IL-8 (p=0,002). **Conclusion:** The composition and location of the inflammatory infiltrate corroborate the immune response mediated by CD3⁺ and CD4⁺T cells on the BCC. The involvement of HLA-G, CD25⁺ and FOXP3 lymphocytes features an immunomodulatory action, and the presence of interleukin IL-8 and Th17 profile (IL-6 and IL-17) may promote neovascularization and suppression of effector cells in the BCC microenvironment providing its development and tumor escape.

Key-Word: Basal Cell Carcinoma. HLA-G Antigens. Cytokines. Immunohistochemistry. Real Time Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto clínico do CBCn.....	26
Figura 2 - Aspecto clínico do CBCs.....	27
Figura 3 - Aspecto clínico do CBC esclerodermiforme.....	28
Figura 4 - Algoritmo para tratamento do CBC	34
Figura 5 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para CD3 em amostra de CBCn.....	70
Figura 6 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para CD3 em amostra de CBCs.....	71
Figura 7 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para CD4 em amostras distintas de CBC.....	72
Figura 8 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para CD25 em amostras CBCn.....	73
Figura 9 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para CD25 em amostras de CBCs e CBCn.....	74
Figura 10 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para HLA-G em amostra de CBCs.....	75
Figura 11 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para HLA-G em amostra de CBCn.....	76
Figura 12 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para HLA-G em amostras de CBCs.....	77
Figura 13 - Aspectos histológicos e imunomarcacão em amostra de CBCn.....	78
Figura 14 - Aspectos histológicos e imunomarcacão de FOXP3 em amostra de CBCn.....	79
Figura 15 - Aspectos histológicos e imunomarcacão para VEGF de em amostras de CBCs e CBCn.....	80

Figura 16 - Diferenciação da linhagem efetora das células T CD4 ⁺	114
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Fatores que influenciam o prognóstico dos CBC.....	29
Tabela 2 - Indicações da cirurgia micrográfica de Mohs.....	36
Tabela 3 - Lista dos anticorpos primários.....	58
Tabela 4 - <i>Primers</i> utilizados na reação de qPCR.....	64
Tabela 5 - Características do grupo de estudo quanto a número de pacientes, sexo, idade média e desvio padrão, distribuídos segundo subtipo clínico de carcinoma basocelular.....	67
Tabela 6 - Características das amostras dos diferentes subtipos do carcinoma basocelular (n=26) submetidas ao estudo.....	68
Tabela 7 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas (Cneo)nas variadas intensidades para CD3 em carcinomas basocelulares (n=26)	82
Tabela 8 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para CD4 em carcinomas basocelulares (n=26).....	83
Tabela 9 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para CD25 em carcinomas basocelulares (n=26).....	84
Tabela 10 -Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para FOXP3em carcinomas basocelulares (n=26).....	85
Tabela 11 -Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para HLA-G em carcinomas basocelulares (n=26).....	86
Tabela 12 -Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades paraVEGF em carcinomas basocelulares (n=26).....	87
Tabela 13 -Frequência de imunomarcção dos neovasos perineoplásicos(PN)para VEGF em carcinomas basocelulares (n=26).....	88
Tabela 14 -Análise por meio do teste exato do χ^2 da imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) com CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF nos diferentes subtipos do carcinoma basocelular (n=26).....	89

Tabela 15 -Análise por meio do teste exato do χ^2 da imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) com CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF, segundo localização do carcinoma basocelular (n=26).....	90
Tabela 16 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidadeleve para CD3 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	91
Tabela 17 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidade leve para CD4 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	91
Tabela 18 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidadeleve para CD25 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	92
Tabela 19 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidadeleve para FOXP3 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	92
Tabela 20 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidadeleve para HLA-G nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	93
Tabela 21 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidadeleve para VEGF nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	93
Tabela 22 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidademoderada para CD3, CD4, FOXP3 e VEGF nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	94
Tabela 23 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidademoderada para CD25 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	95
Tabela 24 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidademoderada para HLA-G nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	95
Tabela 25 -Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em intensidadeacentuada para HLA-G nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	96
Tabela 26 -Porcentagem média e desvio padrão para imunomarcção perineoplásica (PN) para CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF de diferentes subtipos e topografias do carcinoma basocelular (n=26).....	97
Tabela 27 -Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26).....	98

Tabela 28 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) para as topografias cefálicas e não-cefálicas de carcinoma basocelular (n=26).....	99
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Média $\pm$ Desvio padrão da expressão relativa de mRNA em amostra de pele normal, CBCn e CBCs..... 101
- Gráfico 2** - Média $\pm$ Desvio padrão da expressão relativa de mRNA em amostra de pele normal, CBCn e CBCs..... 102
- Gráfico 3** - Expressão relativa de mRNA por amostra de CBC de localização cefálica (a) e não-cefálica (b)..... 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5 – Fluorouracil
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Célula apresentadora de antígeno
BCC	Basal cell carcinoma
Bcl-2	célula do linfoma B 2 (<i>B cell lymphoma 2</i>)
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CBC	Carcinoma basocelular
CBCn	Carcinoma basocelular nodular
CBCs	Carcinoma basocelular superficial
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar (<i>complementary Deoxyribonucleic acid</i>)
CEC	Carcinoma espinocelular
CL	Células de Langerhans
Cneo	Células neoplásicas
COX-2	Ciclooxigenase 2
C _P	Pontode cruzamento (<i>crossing point</i>)
C _q	Ciclode quantificação (<i>quantification cycle</i>)
C _T	Ciclo limite(<i>threshold cycle</i>)
CTLA-4	Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DAB	Diaminobenzidina
DJT	Derme justatumoral
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
DPN	Derme papilar normal

DPNL	Derme papilar não-lesada
ed.	Edição
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EN	Epiderme normal
ENL	Epiderme não-lesada
et al.	E outros
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXP3	<i>Forkhead Box Protein 3</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GITR	Gene relacionado com a família TNFR induzida por glicocorticoides
HCRP	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
IFN	Interferon
IHQ	Imunoistoquímica
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MHC Ia	Complexo de histocompatibilidade principal clássico
MHC Ib	Complexo de histocompatibilidade principal não-clássico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Células <i>Natural Killer T</i>
PBS	Solução salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PTCH	Gene humano homólogo da <i>Drosophila</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RT	Região tumoral
RUV	Radiação ultravioleta
SERPAT	Serviço de Patologia
Tc	Linfócito T citotóxico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF	Fator de crescimento tumoral
Th	linfócitos T auxiliares (T <i>helper</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T regulatória
TSP-1	Trombospondina-1
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	grau centígrado
cm	centímetro
mm	milímetro
mm²	milímetro quadrado
mMol/l	milimolar por litro
n°	número
nm	nanômetro
µl	microlitro

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Carcinoma Basocelular.....	23
1.1.1 Epidemiologia.....	23
1.1.2 Etiopatogenia.....	24
1.1.3 Manifestações clínicas.....	25
1.1.3.1 Carcinoma basocelular nodular (CBCn).....	26
1.1.3.2 Carcinoma basocelular superficial (CBCs).....	27
1.1.3.3 CBC esclerodermiforme ou <i>morfeia-like</i>	27
1.1.3.4 Outros tipos clínicos.....	28
1.1.4 Diagnóstico e prognóstico.....	29
1.1.5. Histopatologia.....	30
1.1.5.1 CBCn.....	31
1.1.5.2 CBCs.....	31
1.1.5.3 CBC esclerodermiforme ou <i>morfeia-like</i>	31
1.1.5.4 Outros subtipos hispatológicos.....	32
1.1.6 Opções terapêuticas.....	32
1.1.6.1 Cirurgia convencional.....	34
1.1.6.2 Cirurgia micrográfica de Mohs.....	35
1.1.6.3 Curetagem e eletrocoagulação.....	36
1.1.6.4 Criocirurgia.....	37
1.1.6.5 Imiquimod, 5-Fluorouracil (5-FU), Vismodegib e Mebutato de Ingenol.....	37
1.1.6.6 Terapia fotodinâmica.....	38
1.1.6.7 Radioterapia.....	39
1.2 Imunomodulação.....	40
1.3 <i>Forkhead box protein 3</i> (FOXP3).....	42
1.4 Antígeno leucocitário humano G (HLA-G).....	43
1.5 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	45
1.6 Citocinas.....	47

2 OBJETIVOS	51
2.1 Objetivo geral	52
2.2 Objetivos específicos	52
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	53
3.1 Procedimentos gerais	53
3.2 Amostragem e casuística do estudo	54
3.3 Análise imunoistoquímica	55
3.3.1 Princípios do método	55
3.3.2 Execução do método	56
3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	58
3.4.1 Princípios do método	58
3.4.2 Quantificação do mRNA	60
3.4.3 Execução do método	61
3.5 Análise Estatística	64
4 RESULTADOS	66
4.1 Caracterização do grupo de estudo	66
4.2 Imunomarcção nos fragmentos de subtipos do CBC	68
4.2.1 Análise da imunomarcção de células neoplásicas (Cneo)	87
4.2.2 Análise da imunomarcção perineoplásica (PN)	95
4.3 Expressão de citocinas nos subtipos de CBC	99
5 DISCUSSÃO	104
6 CONCLUSÕES	119
REFERÊNCIAS	122
APÊNDICES	143
ANEXOS	147
ARTIGO	149

1INTRODUÇÃO

1.1Carcinomabasocelular

1.1.1 Epidemiologia

O câncer de pele não-melanoma é a neoplasia maligna mais frequente na população mundial (Greinert et al., 2009).O aumento crescente da sua incidência, cerca de 3 a 10% por ano, o torna um problema de saúde pública (Roewert-Huber et al., 2007). O carcinoma basocelular (CBC) ou epitelioma basocelular é uma neoplasia maligna derivada das células não queratinizadas que se originam da camada basal da epiderme, correspondendo a cerca de 75% dos cânceres cutâneos não-melanoma.

O CBC apresenta crescimento lento e localmente invasivo (Telfer et al., 2008). Quando detectado precocemente apresenta altas chances de cura, porém se deixado sem tratamento, a invasão local leva a dano tecidual considerável, com comprometimento da função e da estética.A morbidade resulta da invasão tecidual e destruição local, particularmente emface, pescoço e couro cabeludo.

A literatura mostra que os tumores são mais frequentes em pacientes a partir da sexta década de vida, com discreta prevalência do sexo masculino (Gallagher et al., 1990; Miller et al., 1994; Karagas et al., 1999; Chinem e Miot, 2011; Jurciukonyte, 2013). As áreas fotoexpostas da face, do couro cabeludo e do pescoço são as principais regiões acometidas. Cerca de 20% dos casos envolvem o nariz e 17% o restante da face (Crowson, 2006).

Betti et al. (2009)avaliaram 175 casos de CBC dos subtipos nodular, superficial e esclerodermiforme, de acordo com o sítio primário (cabeça, pescoço tronco e membros), divididos em dois grupos etários: menores de 40 anos e maiores de 90 anos. Os autores observaram que os indivíduos mais jovens apresentam maior prevalência de CBC superficiais e lesões em tronco que os idosos ($p<0.05$ e $p<0.01$ respectivamente). Demonstraram também que o subtipo clínico está associado à região anatômica, independente do sexo e idade, isto é,

ao menos em alguns pacientes a localização do CBC pode favorecer o desenvolvimento de um subtipo em particular.

1.1.2 Etiopatogenia

Segundo Armstrong e Kricke (1995), Gailani e seus colaboradores (1996a), os fatores etiológicos mais significantes parecem ser a predisposição genética e a exposição à radiação ultravioleta, tanto exagerada e intermitente quanto a cumulativa. Acredita-se na possibilidade da pele na infância ser mais suscetível ao efeito carcinogênico da radiação ultravioleta (RUV) (Corona et al., 1996).

A luz ultravioleta (UV) compreende energias com comprimento de onda variando entre 200 a 400nm, subdividindo-se em bandas UVA, UVB e UVC. O espectro UVB (290 a 320 nm) gera dano direto no DNA, mutação de genes supressores de tumor – cerca de 50% dos casos de CBC apresentam mutação no gene Tp53 – e alteração do sistema imune resultando na indução da formação de CBC (Situm et al., 2008). Segundo estudo de Laats e de Gruijl (1996), os maiores tempos de exposição solar com o uso de bloqueadores UVB e o desejo de bronzeamento da população está levando a um aumento do potencial carcinogênico da banda UVA (320 a 400nm) nos últimos 30 anos. É reconhecido um período de latência de 20 a 50 anos entre o dano no DNA causado pela RUV e a manifestação clínica do tumor (Situm et al., 2008).

Os fototipos I e II de *Fitzpatrick*, a história de câncer de pele na família, a idade maior que 50 anos, o sexo masculino, o uso de imunossupressores, a exposição ao arsênico e a radiação ionizante são outros fatores reconhecidos como predisponentes ao desenvolvimento dessa neoplasia (Zak-Prelich et al., 2004). Em CBC de membros inferiores, o sexo feminino apresenta três vezes mais lesões que o masculino (Miki, 1968).

Algumas síndromes genéticas levam a maior propensão ao desenvolvimento de múltiplos CBC, tais como síndrome do nevo basocelular (síndrome de Gorlin), síndrome de Bazex e síndrome de Rombo.

O excesso de atividade das proteínas sinalizadoras da família *Hedgehog* tem sido relacionado com o surgimento de tumores como o CBC, o meduloblastoma e o rabdomiossarcoma. Mais recentemente, essa família de proteínas foi relacionada com a neoangiogênese, podendo, através desse mecanismo, ser também responsável pela formação de neoplasias (Nagase et al., 2008). O gene humano homólogo da *Drosophila* (PNCH), localizado no cromossomo 9q22.3, está frequentemente alterado ou deletado em 60% dos casos de CBC esporádicos (Greinert, 2009).

Indivíduos que tiveram CBC têm maior risco de desenvolvimento de novos tumores basaloides em outras localidades e uma maior chance de desenvolvimento de melanoma, mas não de outras malignidades (Bower et al., 2000).

1.1.3 Manifestações clínicas

Os CBC geralmente apresentam-se como lesão friável, que não cicatriza, sangrante, recorrente, às vezes com bordas peroladas, podendo também ser ulcerada. O grau de vascularização varia, podendo ou não apresentar telangiectasias na superfície. As características clínicas variam de acordo com os diferentes subtipos clínicos do tumor.

Leibovitch et al. (2005) relataram o acometimento perineural em aproximadamente 50% dos casos de CBC perioculares. Nestas situações, podem ser encontrados sintomas algícos, parestesias e paralisias. Niazie Lamberty (1993) sugeriram que, quando ocorre o aparecimento de sintomas neurológicos em locais de tratamento prévio de câncer, a hipótese de acometimento neural deve ser aventada.

1.1.3.1 Carcinoma basocelular nodular (CBCn)

O CBCn é o subtipo clínico mais comum. Consiste em pápula ou nódulo translúcido, geralmente com telangiectasias e borda infiltrada (Figura 1). Além disso, apresenta crescimento insidioso e pode ulcerar na superfície. O diagnóstico diferencial é feito, principalmente, com nevo intradérmico e melanoma amelanótico (McCormack et al., 1997).

Quando o tumor apresenta aumento na melanização é classificado como CBCn pigmentado e tem como principal diagnóstico diferencial o melanoma nodular (K D et al., 2013).

Em casos de ulceração central com permanência da borda infiltrada, de tonalidade perolada e crescimento lento, recebe o nome de úlcera rotunda. Raramente, tem comportamento agressivo, o qual é associado à infiltração de tecidos profundos. Na face, pode comprometer o globo ocular, o nariz e, nos casos de invasão do crânio, a meninge (Gormley et al., 1978).

Figura 1 - Aspecto clínico do CBCn

- (a) Pápula perlácea, com telangiectasias superficiais em dorso nasal.
- (b) Nódulo de bordas perláceas, centro ulcerado, com pigmentação superficial, retroauricular direita.

1.1.3.2 Carcinoma basocelular superficial (CBCs)

Caracterizado por placa ou *patch* eritematoso, bem delimitado, lembrando uma lesão eczematizada (Figura 2), muitas vezes pigmentados (Saldanha et al., 2003). A epiderme que compõe a área central da lesão é geralmente atrófica, com escama aderente, de crescimento centrífugo. Encontram-se predominantemente no tronco e, quando associado ao aumento da vascularização, deve-se diferenciar da doença de Paget e da doença de Bowen (McCormack et al., 1997).

Figura 2- Aspecto clínico do CBCs

Patch eritematoso, descamativo, com bordas perláceas em região pré-auricular direita.

1.1.3.3 CBC esclerodermiforme ou morfeia-like

É uma variante incomum, de crescimento agressivo, que recebe o nome por promover uma intensa fibrose assemelhando-se a uma lesão de morfeia. Apresenta-se como uma placa solitária, amarelada e discretamente atrófica (Figura 3). Essa lesão possui limites imprecisos, mas através da palpação é possível observar a infiltração da derme. Por apresentar uma infiltração dérmica

superior a epidérmica, quando ocorre a ulceração, esta é tardia (Raasch et al., 2006).

Figura 3- Aspecto clínico do CBC esclerodermiforme
Placa solitária, amarelada e discretamente atrófica temporal direita.

1.1.3.4 Outros tipos clínicos

O CBC gigante é definido como uma lesão maior de cinco centímetros de diâmetro, agressiva e com alto risco de recorrência e morbimortalidade (Archontaki et al., 2009).

O fibroepitelioma de Pinkus apresenta uma classificação ainda controversa. Apesar de poder ser categorizado como uma variante do tricoblastoma, pode também ser aceito como um subtipo raro e indolente de CBC. Apresenta-se tipicamente como uma lesão polipoide localizada no tronco de adultos do sexo masculino, entre a quarta e a sexta décadas de vida. Pode ser única ou múltiplas lesões pedunculadas, sésseis, róseas ou normocrômicas, no tronco ou nas extremidades (Su et al., 2006; Pan et al, 2008).

1.1.4 Diagnóstico e prognóstico

O diagnóstico pode ser inferido através do exame clínico dermatológico, sendo que o refinamento diagnóstico pode ser obtido com o uso do dermatoscópio. Um estudo demonstrou que a acurácia diagnóstica é de 70% para dermatologistas experientes, 65% para dermatologistas em início de carreira e 64% entre os residentes da área (Presser et al., 1987).

A biópsia está indicada quando existe dúvida clínica ou quando o subtipo histopatológico da lesão pode influenciar na decisão terapêutica e no prognóstico (Tabela 1), evitando dessa forma a ocorrência de invasão com destruição tecidual e diminuindo as chances de recorrência e metástase (Telfer et al., 2008).

Tabela 1 -Fatores que influenciam o prognóstico dos CBC

Fator	Alto Risco de recorrência
Dimensão	Tumores maiores de 2 cm
Localização	Regiões centro faciais, especialmente ao redor dos olhos, do nariz, dos lábios e das orelhas
Definição das margens cirúrgicas	Margens mal delimitadas
Subtipo histológico	Certos tipos histológicos (micronodular, esclerodermiforme e infiltrativo)
Características histológicas da agressão	Envolvimento perineural e/ou perivascular
Falha de tratamentos prévios	Lesões recorrentes
Imunossupressão	Possível aumento no risco de recorrência

Adaptado de: Telfer NR et al. *Guidelines for the management of basal cell carcinoma. Review.* Br J Dermatol. 2008;159(1):35-48.

A realização de exames de imagem como tomografia computadorizada ou ressonância magnética são justificadas em casos de suspeita de invasão neural, orbitária ou de glândula parótida (Leibovitch et al., 2005).

1.1.5. Histopatologia

Os CBC são classificados de acordo com o seu tipo de evolução (Crowson et al., 1996). As variantes de crescimento indolente são o superficial e o nodular, e as de crescimento agressivo são o infiltrativo, o metatípico (antigo basoescamoso), o esclerodermiforme e, para alguns autores como Betti et al. (2009), o micronodular (por reconhecerem o maior risco de recidiva deste subtipo em relação a variante nodular convencional). Aproximadamente um terço dos tumores apresenta padrões histológicos mistos (Sexton et al., 1990).

As características em comum dos CBC são o predomínio de células basaloides com formação de núcleos em paliçada na periferia, a presença de fenda artefactual entre o epitélio e o estroma, as células com aumento da relação núcleo-citoplasma (núcleos grandes, ovalados, com escasso citoplasma), os graus variáveis de atipia citológica e de atividade mitótica nuclear (Sanderson, 1961).

Nos tumores infiltrativos ocorre uma tendência de crescimento sem apresentação de paliçada, com pouca ou nenhuma formação de ninhos de células basaloides que, conforme penetram nos tecidos profundos, promovem destruição dos mesmos. Infiltrados mastocitários presentes entre os fibroblastos do estroma são frequentemente relacionados com a natureza agressiva do tumor e com a neoangiogênese (Aoki et al., 2003) .

1.1.5.1CBCn

Observam-se massas nodulares de células basaloídes que se estendem para a derme papilar ou reticular, podendo ocorrer formação de espaços císticos gerados pela necrose tumoral, presença de mucina ou perda da adesão celular. A diferenciação em outros elementos – como glândulas écrinas, sebáceas e outras – pode ser visualizada nos tumores nodulares. Cerca de um terço dos casos coexiste o componente superficial (Crowson, 2006). A presença de melanina indica o componente pigmentado observado na clínica.

1.1.5.2CBCs

É caracterizado pela proliferação de células basaloídes atípicas formando um eixo paralelo com a epiderme, com fendas intercelulares preenchidas por material mucinoso, que é, presumidamente, produzido pelas células estromais. As mitoses são infrequentes e os pigmentos de melanina podem ser encontrados ocasionalmente. É recorrente por apresentar múltiplos focos de neoplasia (Saldanha et al., 2003).

1.1.5.3 CBC esclerodermiforme ou morfeia-*like*

Apresenta-se como faixas finas de células neoplásicas invasivas em um estroma densamente colagenizado, com invasão neoplásica da derme reticular e tecido subcutâneo. Pode coexistir com outras variantes morfológicas de crescimento agressivo (Takei et al., 1985).

1.1.5.4 Outros subtipos histopatológicos

O CBC micronodular apresenta, assim como o nodular, ninhos de células basaloides, porém de menor tamanho e de distribuição assimétrica, estendendo-se para a derme profunda e para o tecido celular subcutâneo. Sexton (1990), Hendrix (1996) e seus colaboradores sugeriram que essas lesões sejam uma variante intermediária entre o subtipo nodular e os subtipos de crescimento agressivo, devido ao fato de serem acompanhadas por proliferação do estroma com características infiltrativa e recidivante.

Nos últimos anos, tem-se considerado o CBC metatípico, antes conhecido como basoescamoso (de Faria et al., 1985) uma nova entidade, por se apresentar como um tumor intermediário entre o CBC e o carcinoma espinocelular (CEC), tanto na histologia como no comportamento (Martin et al., 2000; Garcia et al., 2009).

Em revisões de literatura, observam-se que alguns CBC apresentam uma variedade específica de diferenciação celular que não implica no prognóstico. São eles: o CBC ceratótico (de Faria et al., 1985), o epitelioma superficial com diferenciação sebácea (Lee et al., 2003), o CBC pleomórfico (Garcia et al., 1995), o CBC com diferenciação écrina (Misago et al., 2004), o CBC com diferenciação ductal (Grosshans et al., 2003), o CBC com diferenciação mioepitelial (Zheng et al., 2011), além do fibroadenoma de Pinkus.

1.1.6 Opções terapêuticas

A decisão sobre a terapia a ser implementada leva em consideração a necessidade da completa remoção e destruição do tumor primário, a fim de prevenir recorrências e evitar futuras intervenções. Para isso, o conhecimento da região anatômica e das características histológicas da lesão é de extrema importância.

Antes de definir a opção terapêutica a ser utilizada, deve-se levar em consideração os fatores que influenciam o prognóstico dos CBC (Tabela 1), além

de fatores específicos dos pacientes (estado geral, comorbidades, uso de antiagregantes plaquetários ou anticoagulantes).

Embora o desenvolvimento de opções terapêuticas tópicas e não cirúrgicas ter aumentado nas últimas décadas, o tratamento cirúrgico convencional e a radioterapia permanecem como as principais escolhas para as lesões de alto risco (Bath-Hextall et al., 2007). Por razões ainda desconhecidas, os CBC recorrentes após radioterapia são de difícil resolução através do procedimento cirúrgico convencional e necessitam, muitas vezes, de associações terapêuticas para um novo tratamento (Smith; Grande, 1991).

Wolf e Zitelli (1987), através de informações obtidas por análise de cirurgias de Mohs, demonstraram qual seria a margem adequada para uma maior chance de ressecção completa e cura dos CBC, levando em consideração o tamanho da lesão e a margem cirúrgica estabelecida. Para CBC menores de 2,0 cm de diâmetro, com bordas bem delimitadas, margens cirúrgicas de 3,0 mm levam a 85% de ressecção completa; quando essa margem foi ampliada para 4,0 a 5,0 mm, a cura foi atingida em 95% dos casos.

Os tratamentos disponíveis podem ser divididos em técnicas não cirúrgicas e cirúrgicas, as quais se subdividem em duas categorias: excisional e destrutiva (Kunte; Konz, 2007; Telfer et al., 2008; Skelton, 2009).

Wolff e colaboradores construíram um algoritmo para auxiliar na decisão da melhor terapêutica para cada caso (Figura 4).

Figura 4 -Algoritmo para tratamento do CBC

Adaptado de: Carucci JA, Leffell DJ. *Basal cell carcinoma*. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. New York, New York, USA: McGraw-Hill; 2008:1036–1042.

1.1.6.1 Cirurgia convencional

Na maioria das vezes, o resultado estético é bom, particularmente quando o tumor é excisado e a ferida reparada. Chiller et al. (2000) demonstraram que o uso da curetagem previamente ao procedimento cirúrgico em CBC primários, aumenta a chance de cura e a acurácia na definição da margem tumoral real.

A ressecção incompleta reflete a extensão subclínica do tumor. Outros fatores também podem estar relacionados com a falha no tratamento, tais como a falta de experiência do cirurgião, a região anatômica, o subtipo histológico e a realização de múltiplas exérese durante um mesmo procedimento. De Silva et al. (1985) encontraram 41% de recorrência em CBC com ressecção incompleta. Já Sussman e Liggins (1996) descreveram 30% de recorrência para ressecções incompletas, sugerindo um seguimento de pelo menos três anos para acompanhamento de recidivas. A chance de recorrência aumenta quando ambas

as margens da excisão estão acometidas, quando a exérese incompleta ocorreu em CBC após radioterapia, ou quando há o acometimento de margens profundas. Robinson e Fisher (2000) avaliaram CBC ressecados de forma incompleta, identificaram que o intervalo entre os sinais e sintomas de recorrência e a realização da cirurgia de Mohs foi maior em homens, em indivíduos maiores de 65 anos, que apresentavam tumores no nariz ou região malar, nos subtipos agressivos ou fibrosantes e naqueles que receberam enxertia ($p=0,001$). Concluíram que, devido a maior dificuldade de controle do CBC recorrente o tratamento da margem no pós-operatório no menor período possível leva a cirurgias menos extensas. Caso a reabordagem seja optada em detrimento do seguimento pós-operatório, as técnicas de cirurgia convencional e de cirurgia micrográfica de Mohs são as melhores opções (Telfer et al., 2008).

1.1.6.2 Cirurgia micrográfica de Mohs

Essa técnica combina vários estágios de ressecção com exame minucioso das margens durante o intraoperatório, através de técnicas de congelamento, resultando em altas taxas de cura para lesões de alto risco, associado à preservação máxima de tecido normal (Lawrence, 1999)

As indicações da cirurgia micrográfica de Mohs estão resumidas na tabela 2 (Telfer et al., 2008):

Tabela 2 - Indicações da cirurgia micrográfica de Mohs

Localização em área de alto risco anatômico, incluindo a face, o escalpo, a região periorbital e as sobrancelhas.
Tumores maiores de 2,0 cm.
Subtipos histológicos agressivos.
Tumores recorrentes.
CBC ressecados de forma incompleta.
Locais de radioterapia prévia.
Pacientes imunossuprimidos por transplante de órgão sólido.
Margem clínica indistinguível.
Situações que requerem conservação de tecido para preservação da função e cosmética.
Envolvimento perivascular e perineural.
Legenda: CBC: carcinoma basocelular.

Em revisão retrospectiva de 620 pacientes, obteve-se uma estimativa de cura de 98,8% em CBC primários e 93,3% em casos de recorrência (Wennberg et al., 1999).

1.1.6.3 Curetagem e eletrocoagulação

A técnica consiste na curetagem da lesão em toda sua extensão friável, seguida por eletrocoagulação do leito. Variações incluem os diferentes tipos de cureta e o número de ciclos utilizados para completar o tratamento (Edens et al., 1983), entretanto, um protocolo exato ainda não está estabelecido. O método é utilizado em lesões de baixo risco. Revisões mostram que para tumores até 1,0 cm, a taxa de cura é de 98,8%; para CBCde 1,0 a 2,0 cm, é de 95,5%; já para lesões maiores de 2,0 cm, a chance de cura não atinge 84%, sendo então uma contraindicação relativa ao procedimento (Sheridan et al., 2000).

Atualmente, a curetagem e eletrocoagulação tem sido combinada com várias modalidades terapêuticas tópicas como o imiquimod (Wu et al., 2006), a

terapia fotodinâmica (Soler et al., 2001) e até mesmo a criocirurgia (Nordin et al., 2002), a fim de atingir uma maior possibilidade de destruição completa do tumor.

1.1.6.4 Criocirurgia

A criocirurgia é uma modalidade terapêutica destrutiva, que consiste na aplicação de nitrogênio líquido com temperatura entre -50 a -60°C, levando ao congelamento e posterior destruição do tumor e do tecido adjacente normal, que é adicionado para garantir a destruição de uma possível margem subclínica (Ceilley et al., 2006). Dois ciclos de descongelamento de um minuto são necessários para a destruição tumoral. Tem como desvantagem a impossibilidade de avaliação das margens e do subtipo de tumor tratado.

Gunnarson et al.(1990), Tuppurainen (1995), Buschmann (2002) consideraram esse método como o mais apropriado para lesões periorbitais de baixo risco, com recorrência em cinco anos de até 8%. Também é uma técnica com mínima contração tecidual e bom resultado estético.

1.1.6.5 Imiquimod, 5-Fluorouracil (5-FU), Vismodegib e Mebutato de Ingenol

O imiquimod é um imunorregulador, agonista dos receptores *toll-like* 7, que são expressos em células dendríticas e monócitos, induzindo a produção de citocinas – entre elas o interferon (IFN), o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL) 12 – que ativa a imunidade T auxiliar (T *helper*, Th) 1 (Stockfleth et al., 2003).

Vários estudos demonstram a eficácia do creme de imiquimod a 5% no tratamento do CBCs. As melhores respostas ao tratamento (taxas de cura clínica e histológica foram de 75%) estão associadas ao uso frequente e prolongado (5x/semana) e a intensidade da reação inflamatória local (Geisse et al., 2004).

Estudos do mecanismo de ação do imiquimod indicaram a presença de ativação de células *natural killer*(NK) (imunidade inata), linfócitos T (resposta

imune adaptativa), células apresentadoras de antígeno (APC), e citocinas de padrão Th1 (Gaspari; Sauder, 2010). Urosevic et al. (2003 [a]) demonstraram que após o uso do imiquimod as células tumorais se tornaram mais susceptíveis a apoptose devido a diminuição da expressão de Bcl-2 (B cell Lymphoma 2). A resposta inflamatória foi mista com macrófagos e linfócitos, peri e intratumoral, gerando aumento de produção de IL-10.

O 5-FU é uma pirimidina análoga cujos metabólitos citotóxicos incorporam ao DNA e RNA, induzindo apoptose. É um agente quimioterápico tópico usado no tratamento da ceratose actínica, mas também há descrição para o tratamento de CBCs, com taxas de cura de 56 - 75% (Bahner; Bordeaux, 2013). Epstein (1985) demonstrou uma taxa de 21% de recorrência cinco anos após o tratamento com essa medicação, assim, essa terapêutica deve ser considerada cuidadosamente devido ao alto risco de falha.

O Vismodegib é um inibidor oral da via enzimática Hedgehog, é o primeiro tratamento sistêmico aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para CBC metastático ou localmente invasivo ou para pacientes sem condições cirúrgicas ou radioterápicas (Cirrone; Harris, 2012).

O mebutato de ingenol é uma substância extraída de uma planta australiana *Euphorbia peplus*, uma espécie de látex irritante usado para fins medicinais. Já está aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso no CBCs. O mecanismo de ação da droga parece envolver indução de apoptose e inflamação mediada por neutrófilos liberando proteína quinase C (Fallen; Gooderham, 2012).

1.1.6.6 Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica envolve a ativação de uma droga fotossensibilizante por uma fonte de luz, a fim de produzir radicais livres de oxigênio, que destroem as células tumorais (Bahner; Bordeaux, 2013). O ácido 5-aminolevulínico, uma das drogas existentes, aumenta a produção da protoporfirina tipo IX, um fotossensibilizador endógeno, que se acumula principalmente nas células tumorais. Outra droga existente é o ácido metil-amino-

levulínico, que é mais lipofílico que o anterior, apresentando maior seletividade pelo tumor. Marmur e colaboradores (2004) revisaram casos de terapia fotodinâmica em cânceres de pele não-melanoma e, relataram tratamento efetivo em 100% dos CBCs, porém com taxas de recorrência entre zero a 31%, sendo taxas muito próximas ao tratamento com radioterapia. Mesmo assim devendo ficar restrito para CBCs entre 1 a 2 mm de espessura.

A dor durante a aplicação da fase luminosa é significativa para alguns pacientes, com sensações variáveis, desde um simples desconforto à sensação de queimação, muitas vezes impossibilitando o procedimento. Várias medidas podem ser tomadas para o controle da dor, tais como resfriamento, analgesia ou até mesmo anestesia local. Após a aplicação da luz, seja ela vermelha (630 nm) ou azul (417 nm), inicia-se um processo inflamatório e exsudativo, podendo ocorrer ulceração durante a evolução (Morton, 2003).

1.1.6.7 Radioterapia

A radioterapia é um tratamento efetivo para CBC primários, CBC que recorreram após procedimento cirúrgico, como terapia adjuvante e, provavelmente, como terapia de escolha para CBC de alto risco em pacientes com restritas condições cirúrgicas (Telfer et al., 2008). Existem diferentes tipos de aparelhos que promovem o tratamento: radioterapia superficial (170kV), que é apropriada para lesões acima de 6,0 mm de profundidade; eletroterapia (gerada por altas energias), que penetra mais profundamente nos tecidos; e a braquiterapia, que é útil em lesões sobre superfícies curvas. Diferentes regiões anatômicas apresentam variadas tolerâncias à radioterapia, sendo que a cabeça e pescoço geralmente mostram boa cicatrização.

As vantagens do método são o mínimo desconforto ao paciente e a possibilidade de evitar a realização de procedimentos invasivos em pacientes sem condições clínicas. Já as desvantagens são a falta de verificação das margens histológicas do tumor, o curso prolongado do tratamento, o resultado estético que muitas vezes é pior que o do procedimento cirúrgico e a predisposição a recorrências agressivas e extensas (Kwan et al., 2004).

1.2 Imunomodulação

O impacto da imunossupressão sobre o desenvolvimento dos cânceres cutâneos não-melanoma é destacado pelo aumento da incidência em pacientes soropositivos (Silverberg et al., 2013).

A RUV, o principal fator etiológico deste tumor, tem efeitos no sistema imune local e sistêmico. O efeito da RUV sobre o sistema imunológico foi investigado por análise da hipersensibilidade cutânea tardia. Yoshikawa et al. (1990) demonstraram que para os indivíduos tratados anteriormente para câncer de pele, praticamente todos eram sensíveis aos efeitos da imunossupressores da RUV, indicando que a suscetibilidade à imunossupressão induzida pela radiação pode ser um fator de risco para câncer de pele. A luz UV dificulta a resposta imune cutânea, especialmente a função das células de Langerhans (CL), resultando em tolerância imunológica para o desenvolvimento de células tumorais (Gaspari; Sauder, 2003).

Um mecanismo sugerido para mediar o efeito imunossupressor da RUV é a alteração nas CL. Os raios UV prejudicam sua capacidade de apresentar antígenos a linfócitos Th1 e a radiação também estimula os queratinócitos a produzirem certas citocinas, incluindo o TNF e IL-10, as quais promovem o desenvolvimento de células T supressoras (Amerio P et al., 2001).

Geralmente, a resposta imune às lesões de CBC não é adequada para remover estas neoplasias, no entanto, as vias imunes, inata e adquirida, possuem algum papel na vigilância imunológica (Gaspari; Sauder, 2003). A imunidade mediada por células depende de interações diretas entre linfócitos T e APC, a fim de processar e apresentar antígenos tumor-associados, sendo este braço da imunidade adquirida crucial para a regressão do CBC (Gaspari; Sauder, 2003).

Os linfócitos T citotóxicos, também necessitam do auxílio de células Th, que podem ser divididas em Th-1, produtoras de IFN- γ , e as Th-2, produtoras de IL-4, IL-5, IL-6, tendo portanto cada célula T *helper* um perfil diferenciado de secreção de citocinas.

Gambichler et al. (2006) descreveram a expressão de citocinas no tumor, na pele normal perilesional e na pele normal de controles, sendo que a expressão de RNA mensageiro (mRNA) de IL-6 e IL-8 mostrou-se elevada no

tumor em relação aos demais, sugerindo o papel dessas citocinas no desenvolvimento e/ou progressão do tumor.

Ambos os linfócitos T CD4⁺ (células secretoras de citocinas) e o linfócitos T CD8⁺ (células efetoras citotóxicas) são necessários para a regressão tumoral na maioria dos modelos animais de tumor, incluindo o câncer de pele (Halliday GM et al., 1995).

As células T CD4⁺ constituem componentes importantes da resposta imune adaptativa cuja capacidade principal é de auxiliar na resposta imune humoral e celular (Smyth et al., 2006). Existe grande diversidade funcional entre as células CD4. O conhecimento de que certas subpopulações mais regulam do que auxiliam a resposta imune tem se tornado cada vez mais evidente. A subpopulação CD4⁺CD25⁺ é a melhor caracterizada, parece ter um papel ativo na regulação da resposta autoimune patogênica (Akbar et al., 2003).

As células T CD4⁺CD25⁺, naturalmente anérgicas e supressoras, parecem ser produzidas e selecionadas pelo timo normal como subpopulação funcionalmente distinta de células T. O exato mecanismo de seleção tímica das células T regulatórias (Treg) ainda não está estabelecido (Sakaguchi et al., 2001).

Existem vários subtipos de Treg. Os linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺GITR⁺ ou FOXP3⁺ existem naturalmente, conhecidas como nTreg, são produzidos no timo e executam a modulação da supressão imune através de mecanismo de contato célula a célula. Já aquelas que são estimuladas pela ligação peptídeo-MHC, conhecidas com Tr1, podem ou não ter expressão de FOXP3. As Tr1 têm sua produção extratímica, secretam IL-10 e fator de crescimento tumoral (TGF) β , suprimindo o sistema imune pela liberação dessas citocinas. Estão associadas à tolerância oral e alergias (Roncarolo et al., 2006).

Outra população de células Treg são as Treg CD4⁺ induzidas, conhecidas por aTreg, as quais também apresentam alta expressão de GITR⁺ ou FOXP3⁺. Sua formação também é extratímica e podem suprimir a resposta imune tanto pelo contato célula a célula, como pela liberação de IL-10 e TGF- β pós-sensibilização por antígeno (Wang HY et al, 2004). Encontram-se ainda as células regulatórias não CD4⁺. Linfócitos CD8⁺CD25⁺, CD8⁺CD25⁺FOXP3⁺, e CD8⁺ produtores de IL-10 foram identificados em humanos e tem ações similares as Treg CD4⁺CD25⁺ (Shao et al., 2005). Células *natural killers* T (NKT), subpopulação específica de linfócitos T (0,1%) que partilham função tanto das

NK como dos linfócitos T (Berzofsky et al., 2008), têm sido descritas com função antitumoral e reguladora da imunidade (Moodycliffe et al., 2000).

1.3 *Forkhead box protein 3 (FOXP3)*

FOXP3 é uma proteína que pertence à família de fatores de transcrição *Forkhead Box* caracterizada por um domínio *forkhead*, descrito como uma “hélice alada” cuja função é a regulação do desenvolvimento e proliferação celular (Martin et al. 2010). FOXP3 é considerado o principal regulador no desenvolvimento e função da célula T regulatória (Treg) (Schubert et al., 2001; Fontenot et al., 2003). Sua principal ação é proteger as células do organismo de reação autoimune, inflamação e destruição tecidual, promovendo um bloqueio das células T efetoras (Williams; Rudensky, 2007). Treg foram inicialmente definidas como células T CD4⁺ imunossupressoras que expressam a subunidade alfa da do receptor de IL-2 (o CD25) na sua superfície (Sakaguchi, 2000).

A diminuição na expressão de FOXP3⁺ leva ao aumento de chance de desenvolvimento de doenças autoimunes, enquanto sua superexpressão favorece o escape e a proliferação tumoral (Gavin et al., 2007).

A expressão de FOXP3 foi inicialmente considerada como restrita a células e aos tecidos hematopoiéticos, porém recentemente foi relatada uma marcação com anti-FOXP3 em tecido normal e carcinomatoso. Quando a expressão de FOXP3 foi comparada em células humanas cancerosas e em seus homólogos normais, duas situações opostas foram encontrados. A primeira foi a verificação de expressão citoplasmática de FOXP3 em 60% dos adenocarcinomas pancreáticos e em todas as linhagens celulares de câncer de pâncreas analisadas (Merlo et al. 2009; Hinz et al., 2007), mas não nas células pancreáticas normais. Ebert et al. (2008) observaram a expressão nuclear de FOXP3 em células de melanoma, mas não em melanócitos normais. Em oposto, o FOXP3 foi encontrado expresso em células epiteliais de mama e próstata, mas não em suas variantes carcinomatosas (Martin et al., 2010). Portanto, a expressão de FOXP3 em humanos pode ocorrer tanto em células normais como em células

neoplásicas, podendo ser citoplasmática ou nuclear. A superexpressão de Treg FOXP3⁺ nos tumores tem sido descrita como fatores de pior prognóstico (Chen et al., 2011) .

1.4 Antígeno leucocitário humano G (HLA-G)

Existem moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA) clássicas e não clássicas. As primeiras fazem parte o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) clássico (MHC Ia), e entre elas estão o HLA-A, -B e -C. As moléculas não clássicas compõem o MHC Ib, sendo o HLA-G um dos mais estudados (Schwab et al., 1988; Yan, 2011).

Durante a transcrição do HLA-G, mRNA inicial é subdividido em sete partes; quatro decodificam isoformas ancorada na membrana (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e três são solúveis (HLA-G5, -G6 e -G7). Apenas as isoformas -G1 e -G5 apresentam todos os domínios, permitindo a ligação com a β 2-microglobulina, assemelhando-se dessa forma com as moléculas clássicas de HLA (Rodgers; Cook, 2005; Yan, 2011).

Diferentemente das moléculas de HLA clássicas, o HLA-G executa, exclusivamente, funções imunossupressoras, que modulam através de múltiplos mecanismos a imunidade inata e adquirida (Le Gal et al., 1999). Entretanto, os defeitos no HLA clássico resultam na resistência das células tumorais a ação dos linfócitos citotóxicos.

Pesquisas para vacinas antitumorais iniciaram-se com a descoberta do primeiro antígeno tumoral, o MAGE1 (Romero et al., 1995). O mecanismo de escape de células cancerígenas envolve tanto a resposta imune adaptativa quanto a inata (Gomes et al., 2007). Girardi (2001), Smyth (2006) e colaboradores relataram a capacidade de linfócitos e de NK reconhecerem e destruírem células tumorais, independentemente da apresentação pelo MHC Ia, processo conhecido como imunovigilância.

Quando as células se tornam neoplásicas, sofrem modificações que levam a perda do HLA de classe I, tornando-as suscetíveis a destruição pelas NK. Todavia, por motivos ainda não esclarecidos, isso não ocorre. Acredita-se que as

células tumorais primeiramente iniciam a expressão de HLA inibitórios para então perderem a expressão dos HLA de classe I (Urosevic; Dummer, 2008). Rebmann et al. (2007) sugeriram que tanto o aumento na expressão do HLA-G, como a perda do HLA clássico são responsáveis pelos mecanismos de escape imune tumoral.

O HLA-G está presente primariamente no trofoblasto placentário, sendo responsável pela tolerância materno-fetal. É também encontrado em várias neoplasias malignas, tais como o carcinoma de células renais, o carcinoma mamário, o glioblastoma, o carcinoma de grandes células do pulmão, os linfomas de células B cutâneos, os cânceres colorretais e o melanoma (Rouas-Freiss et al., 2005). Rebmann et al. (2007) aventaram a hipótese de que a expressão do HLA-G representa uma forma das células tumorais evadirem o sistema imune do hospedeiro de forma similar ao que ocorre com as células fetais invadindo a decídua sob a tolerância imunológica materna no período gestacional.

A expressão do HLA-G tem sua transcrição regulada em várias linhagens de células tumorais por citocinas, tais como a IL-10, o TNF- α e o IFN- γ (Urosevic; Dummer, 2003a).

Cerca de 174 lesões melanocíticas foram analisadas (nevus, lentigos e melanomas metastáticos). A expressão de HLA-G se demonstrou ser maior nas lesões de melanoma quando comparado com lesões névicas ($p < 0,0003$) sugerindo que a superexpressão do HLA-G está associada a transformação maligna (Ibrahim et al., 2004).

Aractingi et al. (2003) analisaram vários tumores malignos epiteliais e lesões cutâneas benignas de pacientes transplantados renais através de técnicas de imunoistoquímica (IHQ), usando anticorpos anti-HLA-G. A proteína foi expressa em 35% dos espécimes de carcinoma espinocelular, em 47% dos carcinomas *in situ*, em 27% das ceratoses actínicas e em 14% dos CBC, porém nenhuma das 24 lesões benignas apresentou qualquer marcação, demonstrando que a expressão de HLA-G é restrita a lesões malignas.

Rompel e colaboradores (1995) promoveram uma avaliação sorológica para HLA-DR4, -Cw7, -A11, -B17, -B22 e -Cw3 (HLA de classe I e II) em 49 pacientes alemães, não consanguíneos, com cinco ou mais CBC. O HLA-DR4 mostrou ter uma associação negativa ao desenvolvimento de múltiplos CBC. O HLA-Cw7 apresentou-se aumentado em todos os pacientes com o tumor. Os

pacientes com CBC em tronco (n=25) revelaram um aumento de expressão de HLA-A11, -B17 e -Cw3. Porém, nenhuma dessas variações foi significativa estatisticamente.

Urosevic e colaboradores (2005) analisaram a expressão do HLA-G e o impacto na recorrência de uma série de CBC – histologicamente comprovados – tratados com radioterapia superficial. Neste estudo, 40 pacientes foram tratados com radioterapia entre 1981 e 1991 no Departamento de Dermatologia do Hospital Universitário de Zurique, com avaliações clínicas em um, três, seis e doze meses após o tratamento. Posteriormente foram submetidos a avaliações anuais nos cinco anos seguintes. Um total de 38 amostras de CBC primário e 14 de tumores recidivantes, sendo 11 CBCs, 16 CBCn e 25 CBC esclerodermiforme, foram utilizadas. Através técnicas de IHQ, observaram a presença de HLA-G em 47 tumores (90%). Em 28 (60%) foi observado forte marcação, correlacionando-se com o tipo histológico do tumor. Os CBCn primários apresentaram predominância na expressão do HLA-G; enquanto nos tumores recidivados, os CBC esclerodermiformes superavam os demais na expressão da molécula. Relataram também que os tumores não recorrentes após a radioterapia expressavam HLA-G nas células inflamatórias peritumorais. Dessa forma, concluíram que o HLA-G parece estar associado ao fenótipo agressivo, assim como já demonstrado em outros tipos de câncer.

1.5 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A vascularização dos tecidos saudáveis não suporta o crescimento de tumores maiores que 3,0 mm de diâmetro. A neoangiogênese é necessária para a sobrevivência, invasão e metástase tumoral (Folkman et al., 1971).

A neovascularização tumoral ocorre por diferentes mecanismos que dependem do tipo de tumor, do seu estado de desenvolvimento e da localização anatômica. As células endoteliais que formam a parede dos vasos são ativadas, sua matriz extracelular é degradada e ativada para proliferação. As novas células

endoteliais se organizam em formações tubulares e iniciam anastomoses para formação de novos capilares (Risau, 1997).

A partir desse momento, o desequilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos passa a controlar a neoangiogênese. A hipóxia gerada pelo acúmulo de células tumorais promove estímulo a liberação de fatores pró-angiogênicos, tais como o VEGF, o fator de crescimento de fibroblastos, o fator transformador de crescimento β e o TNF- α (Ferrara; Keyt, 1997). O VEGF promove a proliferação de novas células endoteliais e aumentam a permeabilidade vascular, permitindo a criação de um gel de fibrina que suporta o novo crescimento vascular (Larcher et al., 1996).

Jee e colaboradores (2004) avaliaram o papel da IL-6 na gênese tumoral do CBC. Realizaram a transfecção de vetores de expressão de IL-6 em células de CBC humanas, encontrando níveis elevados de fatores pró angiogênicos como a ciclooxygenase 2 (COX-2) e o VEGF nas células transfectadas. Sugerindo que o aumento da IL-6 promove a atividade tumorigênica do CBC tanto pela supressão da apoptose como pela promoção de angiogênese.

Células transfectadas com COX-2 se tornam resistentes a apoptose induzida por radiação UVB, apresentam maior atividade angiogênica e têm aumento do mRNA e da proteína VEGF-A, sendo que através dessa substância a proliferação neovascular é estimulada. (Jee et al., 2004).

Loggini et al. (2003) analisaram o padrão angiogênico do CEC (n=13) e do CBC (n=26) e apontaram as diferenças na densidade microvascular que justificariam suas diferenças de comportamento biológico. Analisaram a densidade vascular (marcação IHQ para CD34) e os níveis de mRNA do VEGF, definiram que tumores com menos de 33 vasos por $2,22 \text{ mm}^2$ seriam considerados tumores de baixa densidade vascular e, os com concentrações maiores seriam tumores de alta densidade vascular. Dessa forma, 12 dos 13 CEC foram considerados tumores de alta densidade vascular, enquanto 19 dos 26 CBC apresentavam-se como neoplasias de baixa densidade vascular. Da mesma forma os CEC apresentavam uma alta concentração de VEGF-RNA, enquanto os CBC apresentavam-na baixa. Assim, a maior angiogênese e a maior agressividade dos CEC estariam relacionadas com a expressão do VEGF.

Oh e colaboradores (2003), avaliaram a expressão de alguns marcadores, entre eles o VEGF, nos diferentes tipos de CBC. Encontraram que os

CBC agressivos apresentavam uma expressão 3,5 vezes maior de VEGF, associado a um aumento da densidade vascular, sugerindo que o VEGF possui um papel fundamental na agressividade dos CBC.

Bowden et al.(2002) avaliaram a expressão de VEGF através de IHQ em 44 casos de CBC e 41 de CEC. O VEGF apresentou expressão nas células endoteliais dos vasos da pele adjacente e na região do tumor, e também nos queratinócitos da camada basal da epiderme. Nos casos de CBC, o VEGF foi expresso em células epiteliais tumorais, predominantemente em tumores invasivos (24/44 casos), sendo essa expressão significativamente maior que na pele adjacente ($p=0,038$).

É provável que os mastócitos peritumorais presentes nos CBCs sejam responsáveis pela produção de VEGF e outras citocinas e, com isso, regulem a estimulação angiogênica tumoral (Aoki et al., 2003).

1.6 Citocinas

As citocinas são moléculas proteicas que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Podem ter função autócrina, agindo na própria célula produtora; parácrina, atuando em células próximas; e endócrina quando sua ação se dá a distância (Roit et al., 1999).

A IL-4 é uma citocina sintetizada principalmente por células Th2. Induz a proliferação e diferenciação de células B, aumenta a expressão de MHC de classe II, possibilitando maior ativação da resposta Th2. Aumenta ainda a expressão de receptores de alta afinidade para Imunoglobulina E em mastócitos e basófilos (Sato et al., 1993). A resposta Th2 parece ser a resposta proeminente no microambiente tumoral do CBC (Kaporis et al., 2007). Essa resposta é caracterizada pela produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e inibida pela IFN- γ (Muranski; Restifo, 2009; Yamamura et al., 1993).

A IL-6 pode ser produzida por vários tipos celulares, principalmente as células B, T e monócitos. Os glicocorticoides inibem a síntese de IL-6, enquanto

TGF- β apenas a diminuir. É uma citocina pleiotrópica que influencia resposta imune antígeno-específica e reações inflamatórias. É um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação, estimulando a produção de proteínas da fase aguda. Tem ainda ação importante na atração de eosinófilos para o local de inflamação (Heirich et al., 1990). Elamin et al. (2008) demonstraram maior concentração de IL-6 em CBC agressivos (infiltrativo e micronodular) quando comparados com os não agressivos (nodular e superficial). A comparação de CBC e pele normal demonstrou uma maior expressão de IL-6 e IL-8 (Gambichler et al., 2006). Jee e colaboradores (2001 e 2004) relataram que a IL-6, via ativação da COX-2, promove angiogênese em CBC e que a presença dessa citocina estaria relacionada com o maior poder tumorigênico e maior resistência a apoptose nos tumores basaloides.

A IL-10 é produzida principalmente por células CD8⁺ ativadas, porém também é secretada por células Th2 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos ativados. O seu principal efeito é inibidor, coíbe a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β . Inibe a proliferação de células Th1, diminuindo a função citolítica dessas células, facilitando o desenvolvimento de respostas tipo Th2 (Thompson-Snipes et al., 1991). Kim e colaboradores (1995) sugeriram que a presença de IL-10 no ambiente tumoral seria responsável por produzir um ambiente permissivo ao escape tumoral.

O IFN- γ é produzido principalmente por células B, T e NK. Tem atividade antiviral e antiparasitária, porém sua principal atividade é imunomoduladora. Inibe a proliferação de células que sintetizam as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, levando a priorizar a resposta Th1 direcionando a resposta antitumoral para via citotóxica. A análise das citocinas do CBC e de ceratoses seborreicas demonstrou que as citocinas IL-2 e IFN- γ eram muito mais evidentes na lesão benigna que no tumor (Yamamura et al., 1993).

A IL-8 é uma quimiocina, produzida principalmente por monócitos e macrófagos, porém em menor quantidade por fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, melanócitos, hepatócitos e condrócitos. Sua síntese é estimulada pelo IFN- γ e pelo TNF- α . Sua ação é estimular a migração de neutrófilos e aumentar a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (Baggiolini et al., 1994). Aoki e colaboradores (2003) descreveram altas concentrações de IL-

8 e VEGF no estroma de CBC. Gambichler et al. (2006) correlacionaram o aumento da expressão de IL-6 com IL-8 em CBC e associaram essas citocinas ao microambiente favorável ao desenvolvimento do tumor.

A IL-17 é produzida por células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, porém seu maior produtor é o linfócito T CD4⁺. A IL-17 estimula a secreção de IL-6, IL-8, e prostaglandinas por células endoteliais e epiteliais. A inflamação causada pela IL-17 e IL-23 pode contribuir para a carcinogênese (Langowski et al., 2006). A IL-17 pode favorecer a neovascularização associada ao tumor, potencializando o seu crescimento (Muranski; Restifo, 2009).

Portanto, sendo o CBC a mais frequente neoplasia de pele não-melanoma, há interesse em se reconhecer e identificar possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos nos diferentes padrões de crescimento, de invasão tecidual e de risco prognóstico do tumor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando-se que o câncer cutâneo primário não-melanoma é a forma mais comum de câncer na população caucasiana e, sendo em sua maioria o carcinoma basocelular, a elucidação dos mecanismos imunomoduladores envolvidos no desenvolvimento deste tumor se constitui um atraiante campo de investigação e de perspectivas terapêuticas.

No presente estudo, buscamos avaliar os possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos nos diferentes subtipos e localizações topográficas do CBC, por meio da análise da expressão de citocinas, linfócitos, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e antígeno leucocitário humano G (HLA-G).

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar, por meio da imunoistoquímica, o fenótipo das células linfocitárias e a sua distribuição nos sítios dos diferentes subtipos e localizações topográficas do CBC;
- b) Avaliar, por meio da imunoistoquímica, a expressão e a distribuição do VEGF e do HLA-G nos sítios dos diferentes subtipos e localizações topográficas do CBC;
- c) Caracterizar o perfil de citocinas no microambiente tumoral por meio da reação da polimerase em cadeia em tempo real;
- d) Comparar as diferenças de expressão das células linfocitárias, do VEGF, do HLA-G e das citocinas nos diferentes subtipos do CBC em distintas localizações topográficas;
- e) Identificar, por métodos combinados, a presença de fatores de imunomodulação e as suas possíveis relações no microambiente tumoral.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

Os participantes do estudo foram convidados e selecionados durante o expediente ordinário do Ambulatório de Tumores Cutâneos do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCRP) – Universidade de São Paulo (USP). Como parte da rotina do Serviço, todas as informações referentes à anamnese, ao exame clínico e dermatológico foram registradas nos prontuários.

A inclusão dos indivíduos no estudo foi realizada em acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica do HCRP. O trabalho de pesquisa foi conduzido de forma a contemplar as disposições contidas nas resoluções CNS nº 196/1996 sobre a pesquisa envolvendo seres humanos.

A elaboração do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do sujeito da pesquisa e/ou seu representante legal foi baseada nas resoluções vigentes e seguiu as seguintes orientações: linguagem acessível, esclarecimentos do propósito do estudo e dos procedimentos necessários, da confidencialidade e da privacidade.

Foi assegurado aos participantes a liberdade de opção da não inclusão no estudo, sem prejuízo, atraso ou interferência no seu seguimento, escolha ou realização do tratamento da sua doença. Por meio de informações verbais e contidas no TCLE (APÊNDICE A), os participantes selecionados para o estudo foram previamente informados sobre os objetivos gerais da investigação. Os indivíduos foram esclarecidos sobre os procedimentos a serem realizados, métodos de obtenção das amostras, tratamento proposto, seus riscos e benefícios e receberam cópia do TCLE. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP-USP com processo HCRP nº 4892/2011 (ANEXO A).

Os critérios de inclusão foram a suspeita clínica de CBC, idade superior a 18 anos e a concordância na participação no estudo que consistia na obtenção de fragmentos do tumor durante o ato cirúrgico.

3.2 Amostragem e casuística do estudo

Seguida à seleção de indivíduos com o diagnóstico clínico de CBC, esclarecimentos e aceitação na participação do estudo, as amostras de fragmentos do tumor foram coletadas durante o procedimento cirúrgico da sua exérese. O procedimento cirúrgico seguiu técnicas cirúrgicas padronizadas de assepsia da pele com solução hidroalcóolica de digluconato de clorexidine a 2% e anestesia local com lidocaína a 2% com vasoconstrictor. Sob anestesia pré-operatória, foram retirados fragmentos com punçador (*punch*) de 4 mm: dois com características clínicas mais evidentes do tumor na periferia da lesão, e um outro de pele normal, da área de demarcação das margens visíveis de segurança ou da área doadora para enxertia. Os fragmentos do tumor e da pele normal foram conservados em frascos estéreis com trizol para realização dos ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Em acordo com a rotina do Serviço, a peça extraída foi destinada à análise anatomopatológica pelo Serviço de Patologia (SERPAT) do HCRP-USP. Posterior à análise histológica para emissão do laudo, blocos parafinados do tumor foram solicitados para análise com a técnica de imunoistoquímica (IHQ).

Foram coletadas 40 amostras de fragmentos de CBC, e excluídas 14 amostras nas condições descritas a seguir: três por exames histopatológicos não confirmatórios de CBC; três por histopatologia de tumor de colisão, associação do CBC e CEC; quatro por CBC com mais de dois subtipos histológicos; duas por CBC recidivados e duas por apresentarem material insuficiente para todas as análises do estudo.

3.3 Análise imunoistoquímica

3.3.1 Princípios do método

A IHQ é o conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para a detecção de antígenos presentes em células ou tecidos. Os antígenos podem representar constituintes celulares normais, como uma proteína de membrana, ou pertencer a um elemento estranho à célula como um micro-organismo (Hofman; Taylor, 2013).

É uma técnica essencialmente qualitativa. Embora métodos quantitativos possam ser aplicados em preparações IHQ para se determinar o número de elementos presentes ou a intensidade da reação. Seu objetivo fundamental é o encontro e localização topográfica de antígenos nos tecidos ou células. O resultado final da IHQ deve sempre ser interpretado em conjunto com os achados morfológicos e a clínica, e não simplesmente apenas avaliar a reação como positiva ou negativa (Brasileiro Filho et al., 2006).

Os anticorpos empregados podem ser mono ou policlonais, e devem estar marcados com compostos que depois possam ser visualizados seletivamente (Hofman; Taylor, 2013).

Os anticorpos monoclonais são produzidos *in vitro*, por clones de células plasmáticas. Reagem apenas com um epítipo presente no antígeno, são altamente homogêneos e altamente reprodutíveis lote a lote. Os anticorpos policlonais são produzidos, *in vivo*, por diferentes células e, portanto são diferentes quanto às propriedades imunoquímicas, reagindo com vários epítopos diferentes presentes no antígeno contra o qual foram produzidos (Brasileiro Filho et al., 2006).

3.3.2 Execução do método

As amostras de pele foram fixadas e inseridas em bloco de parafina e posteriormente cortadas com 4µm de espessura e submetidos à reação de IHQ, utilizando o método de HRP-polímero. Os anticorpos utilizados foram os monoclonais CD3 (clone PS1, Novocastra), CD4 (clone BC/1F6, Abcam), CD25 (clone 4C9, Novocastra), HLA-G (clone MEM-G/1, Exbio) e VEGF (clone G153-694, BD) e o anticorpo policlonal FOXP3 (Abcam) (tabela 3).

As lâminas sializadas com cortes parafinados de fragmentos do tumor foram submetidas a etapas consecutivas de desparafinização em xilol, álcool graduado e lavagem em água. Seguidas por recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% para todos os anticorpos, exceto para o CD4, cujo bloqueio foi realizado com peróxido de hidrogênio/metanol/tampão de solução salina (PBS) a 0,5%. Para os anticorpos CD3, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF, a recuperação antigênica ocorreu em panela a vapor por 35 minutos com tampão de citrato de sódio 10mMol/L pH6,0. Já para o anticorpo CD4 a recuperação ocorreu também em panela a vapor porém por 40 minutos e com tampão ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1mMol/L pH8,0. Em seguida, foi realizado o bloqueio da reação proteica inespecífica com *Background Sniper® (Mach 4 Universal HRP-Polymer kit with DAB; Biocare Medical, CA, USA)* por 15 minutos. Os anticorpos primários CD3, CD4, CD25, FOXP3 e HLA-G foram diluídos em albumina de soro bovino (BSA) na concentração 1/100, e o anticorpo VEGF em 1/50. Posterior à incubação *overnight*, as lâminas foram lavadas por três vezes em PBS. Após lavagem, essas lâminas foram incubadas com anticorpo secundário e polímero (*Mach 4 Universal HRP-Polymer kit with DAB; Biocare Medical, CA, USA*). A revelação da reação foi feita em solução de diaminobenzidina (DAB) por 30 segundos em temperatura ambiente, posteriormente lavadas e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 40 segundos, também em temperatura ambiente. Após, foi aplicado hidróxido de amônia, realizado desidratação com álcool, diafanização em xilol e executado a montagem em lâminas Permount (Fisher Scientific, CA, USA).

Os controles positivos para os anticorpos (tabela 3) foram todos obtidos do arquivo do SERPAT do HCRP-USP. Para os controles negativos,

foram empregados cortes histológicos dos mesmos tecidos com a omissão da etapa de incubação com o anticorpo primário e adição de PSB.

Tabela 3 – Lista dos anticorpos primários

Anticorpo	Fonte	Clone	Diluição	Controle positivo
CD3	4	PS1	1:100	Amígdala humana
CD4	1	BC/1F6	1:100	Amígdala humana
CD25	4	4C9	1:100	Amígdala humana
HLA-G	3	MEM-G/1	1:100	Trofoblasto humano
FOXP3	1	Policlonal	1:100	Amígdala humana
VEGF	2	G153-694	1:50	Rim humano

Legenda: 1: Abcam, USA; 2: BD, USA; 3: Exbio, CZ; 4: Novocastra, UK.

A análise quantitativa da imunomarcação para a expressão dos anticorpos nos cortes histológicos de biópsias cutâneas foi realizada através de sistema de análise de imagem que inclui um microscópio (OLYMPUS BX50) acoplado a uma câmera colorida (OLYMPUS DP10) e a um computador, contendo o software (Image Pro Plus, versão 6.0 - Media Cybernetics), do SERPAT do HCRP-USP. A média de 8 a 10 campos com células marcadas foram selecionados de cada lâmina para a análise quantitativa dos diferentes marcadores. As células foram consideradas positivas para todos os marcadores na presença de imunoprecipitado castanho ao redor da membrana plasmática das células epiteliais, imunes ou endoteliais, exceto para o FOXP3 cuja marcação é intracitoplasmática.

As células positivas foram quantificadas em 1.000 células/biópsia, estabelecendo a porcentagem de expressão IHQ para os marcadores selecionados para o presente estudo. As lâminas foram analisadas em conjunto com o Prof. Dr. Edson Garcia Soares do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

3.4.1 Princípios do método

A qPCR é um tipo de PCR quantitativa, uma vez que mede a quantidade de cDNA (DNA complementar) ou de mRNA em uma amostra. É o método mais sensível para determinar e quantificar a expressão do mRNA de um gene (Bustin, 2000).

A qPCR pode ser usada para comparar amostras normais (controle) às amostras da doença, dando uma ideia a respeito das mudanças da expressão que ocorrem com a patogênese. A tecnologia tempo real permite a detecção da amplificação durante a fase exponencial da reação, quando a quantidade do produto da PCR é diretamente proporcional à quantidade de ácido nucleico (Gause; Adamovicz, 1994). Já a PCR tradicional é um método de análise semiquantitativa uma vez que necessita de uma quantificação comparativa em gel de agarose no término da reação (Southern, 1975).

O método utiliza um sistema fluorescente em plataforma capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação. As sondas, específicas para o segmento gênico cuja expressão se deseja estudar, apresentam uma substância capaz de absorver a energia luminosa emitida pelo equipamento e dissipá-la na forma de luz e calor (fluoróforo na posição 5' da sonda), em comprimento de onda diferente do original. Entretanto, na sua posição nativa, toda a luz emitida por esse fluoróforo é absorvida por substância presente na extremidade 3' da sonda. Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar fluorescência no tubo de reação. Por outro lado, se a reação for capaz de gerar produtos, a sonda irá hibridizar-se com o alvo gerado e ficará exposta à atividade da exonuclease da polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróforo ficará distante da substância neutralizadora a qual agora não mais será capaz de absorver a luz emitida (Heid et al., 1996).

O equipamento utiliza uma fonte de luz capaz de excitar o fluorocromo envolvido na reação. A fluorescência eventualmente produzida pela amostra é detectada pelo sistema e, o momento da execução da PCR em que a

fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*) é comumente denominado de C_T (*threshold cycle*), C_P (*crossing point*) ou, mais atualmente, C_q (*quantification cycle*) (Bustin et al., 2009).

A cada estímulo luminoso gerado pelo equipamento corresponderá uma segunda emissão de luz pelo fluoróforo. Portanto, a emissão de luz será proporcional à quantidade de produto gerado no tubo de reação. Esse é, por sua vez, proporcional à quantidade inicial de alvos da reação de amplificação (Mackay, 2004).

Uma maneira comum de revelação fluorescente do produto amplificado consiste na utilização do agente *SYBR Green I*, que se liga de maneira inespecífica ao DNA em fita dupla. O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que DNA dupla fita é gerado, em virtude da concentração do corante *SYBR Green I* entre as cadeias de DNA geradas. A presença de DNA de fita dupla na solução é capaz de aumentar essa emissão de luz em cerca de 100 vezes para uma mesma concentração de *SYBR Green I*. Ambos os sistemas de emissão de luz - sonda *TaqMan* e *SYBR Green* - podem ser utilizados para detecção e quantificação em qPCR (Buh Gasparic et al., 2010).

O *TaqMan* aumenta a especificidade da reação, mas apresenta um maior custo pela utilização de um oligonucleotídeo modificado além dos *primers* habituais para PCR.

O *SYBR Green* é um agente inespecífico e revela qualquer dupla fita gerada na reação de amplificação. Em decorrência desse fato, os ensaios que utilizam esse agente devem ter desenho cauteloso para se evitar possível viés (Buh Gasparic et al., 2010).

3.4.2 Quantificação do mRNA

Os dois métodos mais utilizados para analisar os resultados da qPCR quantitativa são a quantificação absoluta e a quantificação relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópia iniciais relacionando o sinal PCR com uma curva padrão, devendo ser usada prioritariamente quando é necessário se conhecer o número absoluto de transcritos. Já a quantificação relativa analisa as mudanças na expressão do gene alvo relacionando-o a um gene de referência ou controle, deve ser usada quando se faz necessária a comparação entre esses grupos, como por exemplo, grupo de estudo tratado com um grupo controle não tratado (Liväk; Schmittgen, 2001). A análise relativa é mais utilizada que a absoluta na maioria dos estudos de qPCR. A quantificação relativa da qPCR requer o uso de modelos matemáticos acurados para seu cálculo, sendo o método do $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) o mais utilizado (Chang et al., 2009). A quantidade do gene alvo, normalizado para um gene referência/controle endógeno e relativizado para um calibrador é equivalente a $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Os genes de referência/controle mais aceitáveis e utilizados são o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), a β -actina e a β_2 -microalbumina (Liväk; Schmittgen, 2001).

Para o cálculo do método do ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) é necessário a identificação do C_q , a fase exponencial de amplificação e proceder as seguintes equações:

a.) Cálculo do valor do delta C_q (ΔC_q) onde:

$$\Delta C_q = C_{q(\text{alvo})} - C_{q(\beta\text{-actina/Controle})};$$

b.) Cálculo da média do valor ΔC_q em casos de amostras em duplicatas:

$$\text{Média do } \Delta C_q = (\Delta C_{q \text{ duplicata 1}} + \Delta C_{q \text{ duplicata 2}}) / 2;$$

c.) Cálculo do valor do calibrador:

$$\text{Calibrador} = \text{Média do } \Delta C_{q \text{ do grupo controle}};$$

d.) Cálculo do valor $\Delta\Delta C_q$:

$$\Delta\Delta C_q = \text{Média do } \Delta C_q - \text{Calibrador};$$

e.) Cálculo do valor $2^{-\Delta\Delta C_q}$ para cada amostra.

3.4.3 Execução do método

As amostras armazenadas em trizol foram maceradas utilizando o triturador IKA® T10 basic, Ultra-Turrax. Foi adicionado 200µl de clorofórmio puro, para agitação em vórtex (Fisher Vortex Genie 2, da Fisher Scientific®). Posteriormente, foi centrifugado a 4°C por 15 minutos à 12.000g em centrífuga Eppendorf 5804R, a 10.690 rotações por minuto.

Ocorreu a formação de três fases: uma incolor superior, contendo o RNA de interesse; outra brancacenta intermediária, com restos celulares e proteínas; e por último uma rósea inferior, contendo o trizol e os restos orgânicos.

A fase superior foi transferida para tubos *eppendorf* estéreis, seguindo o processo de isolamento do RNA (*RNAspin Mini RNA Isolation Kit*®, GE Healthcare), que consistiu nas etapas subsequentes descritas a seguir:

- a. Adição de 350µl de etanol 70%, homogeneização em vórtex por duas vezes durante cinco segundos;
- b. Passagem do homogeneizado 2 a 3 vezes pelo *RNAspin Mini column* (*RNAspin Mini RNA Isolation Kit*®, GE Healthcare), com posterior centrifugação por 30 segundos à 8.000g (10.000rpm);
- c. Dessalinização da membrana sílica através da adição de 350µl de buffer dessalinizador de membrana (*RNAspin Mini RNA Isolation Kit*®, GE Healthcare), e posterior centrifugação à 11.000g (12.000rpm) por 1 minuto a fim de secar a membrana, descartando o filtrado;
- d. Adição de 10µl de DNase I e 90µl de Buffer de reação de DNase (ambos do *RNAspin Mini RNA Isolation Kit*®, GE Healthcare), homogeneização em vórtex e incubação por 15 minutos a 27°C;
- e. Lavagem e secagem da membrana sílica, em 3 etapas, em acordo com as orientações recomendadas para o uso do *kit*;
- f. Eluição do RNA a 60µl;
- g. Quantificação da concentração de RNA em cada amostra através do espectrofotômetro (Thermo Scientific Nanodrop® 1.000).

Para a realização da qPCR, foi utilizado *SYBR Green* (qPCR *SuperMix-UDG with ROX e GeneAmp*® *Sequence Detection System*, Applied

Biosystems®). Os *primers* IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-23, IFN- γ , FOXP3 e o gene controle (β -actina) foram projetados usando o programa de computador para composição de *primers* (PE Biosystems®), produzidos pela Invitrogen e estão listados na tabela 4. As amplificações de PCR foram realizadas em um volume total de 15 μ l, contendo uma amostra de 5 μ l RNA, 0,5 μ l de cada primer, 2,5 μ l de água MiliQ e 6,5 μ l II *SYBR Green PCR Mix*. A análise de todas as amostras foi feita em duplicata. O gene β -actina foi usado para normalizar as amostras. Todas as reações tiveram controle negativo interno em que o RNA foi substituído por água destilada.

A reação de PCR foi executada no *Applied Biosystems Step One Plus™ Real-Time PCR System with Thermal Cycling Block* (Applied Biosystems®) iniciando a 50°C por 2 minutos, seguida por 10 minutos de desnaturação inicial com temperatura de 95°C, realizado por conseguinte 40 ciclos para amplificação, compostos por ciclos de 15 segundos a 95°C para desnaturação, 30 segundos a 58°C para anelamento e 30 segundos a 72°C para alongamento.

Foi identificado o C_q na fase exponencial de amplificação, e em seguida foram calculadas as médias dos valores de C_q para cada duplicata e a análise por meio do algoritmo ou método do $2^{-\Delta\Delta C_q}$ para a obtenção dos resultados.

Para encontrarmos o valor de interesse ($2^{-\Delta\Delta C_q}$), procedeu-se com as seguintes operações:

- a. Cálculo do valor do delta C_q (ΔC_q) onde:

$$\Delta C_q = C_{q(\text{citocina X})} - C_{q(\beta\text{-actina})};$$

- b. Cálculo da média do valor ΔC_q das duplicatas das amostras do tumor:

$$\text{Média do } \Delta C_q = (\Delta C_{q \text{ duplicata 1}} + \Delta C_{q \text{ duplicata 2}}) / 2;$$

- c. Cálculo do valor do calibrador:

$$\text{Calibrador} = \text{Média do } \Delta C_q \text{ da pele normal};$$

- d. Cálculo do valor $\Delta\Delta C_q$:

$$\Delta\Delta C_q = \text{Média do } \Delta C_q - \text{Calibrador};$$

- e. Cálculo do valor $2^{-\Delta\Delta C_q}$ para cada amostra de tumor analisada.

Tabela 4 - Primers utilizados na reação de qPCR

Citocinas	Primers em sequência 5'- 3'
Hu β-actinaF	TGA CTC AGG ATT TAA AAA CTG GAA
Hu β-actinaR	GCC ACA TTG TGA ACT TTG GG
Hu IL-4F	CCC TCG GTT TCA GCA ATT T
Hu IL-4R	TAT CAG GAG AAG CTA ACG ATG C
Hu IL-6F	CAA ATT CGG TAC ATC CTC GA
Hu IL-6R	TGC TGC TTT CAC ACA TGT TAC T
Hu IL-8F	TGC CTT GGT TTC TCC TTT ATT
Hu IL-8R	GCT TCC ACA TGT CCT CAC AA
Hu IL-10F	TTC CCT GAC CTC CCT CTA ATT
Hu IL-10R	GCT CCC TGG TTT CTC TTC CTA A
Hu IL-17F	TTT CTC CCC TAG ACT CAG GCT T
Hu IL-17R	GTT GGT CTG TTG ATC TCT GAG G
Hu IL-23F	CAG ATT TGA GAA GAA GGC AAA AA
Hu IL-23R	GCA GCA ACA GCA GCA TTA CA
Hu IFN-γF	ACT TCT TTG GCT TAA TTC TCT CG
Hu IFN-γR	GAG AAC CCA AAA CGA TGC A
Hu FOXP3F	AGG AAA GGA GGA TGG ACG AA
Hu FOXP3R	AGG CAA GAC AGT GGA AAC CT

Legenda: Hu: humano; F: *fowardprimer*; R: *reverseprimer*.

O ensaio e análise das citocinas foram realizados no laboratório de Imunologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com auxílio e orientação do Prof. Dr. João Santana da Silva.

3.5 Análise Estatística

Para execução da análise estatística foi utilizado o programa GraphPad InStat3 (GraphpadSoftware, *INC, CA, USA*) e para construção dos gráficos o programa GraphPad Prism 6 (GraphpadSoftware, *INC, CA, USA*).

Foi realizado a análise estatística descritiva com cálculo da média, mediana e desvio padrão para as variáveis cabíveis.

A análise das variáveis categóricas sexo (feminino/masculino) e marcação de células neoplásicas (sim/não) foi feita pelo Teste do Qui-Quadrado (χ^2).

Foi realizado o teste de normalidade de D'Agostino e de Pearson para saber se amostras tinham distribuição normal. Como as amostras não apresentavam distribuição normal e não eram pareadas, procedemos os testes não paramétricos de Mann-Whitney. A correlação entre as citocinas foi analisada pelo coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman.

Foram considerados estatisticamente significante os valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do grupo de estudo

O grupo de estudo foi constituído por vinte e seis pacientes com diagnóstico clínico e histopatológico de CBC primário, quatorze do sexo masculino (14/26; 54%) e doze do sexo feminino (12/26; 46%), com idade mínima de 35 anos e máxima de 89 anos, média de 72,96 anos, mediana de 74,5 anos para a amostra geral; e média de 74,7 anos para os homens e 70,9 anos para as mulheres. Na distribuição por grupo etário, 3,85% (1/26) encontravam-se na faixa entre 31 e 40 anos, nenhum indivíduo entre 41 e 50 anos, 11,54% (3/26) entre 51 e 60 anos, 15,38% (4/26) entre 61 e 70 anos e 69,23% (18/26) acima de 71 anos.

A distribuição dos pacientes segundo subtipo clínico de CBC resultou em dezesseis pacientes no subgrupo de CBCn e dez no subgrupo de CBCs, conforme descrito nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Características do grupo de estudo quanto a número de pacientes, sexo, idade média e desvio padrão, distribuídos segundo subtipo clínico de carcinoma basocelular

	Número de Pacientes (n)	Sexo Feminino (n)	Sexo Masculino (n)	Idade Média $\pm$ DP (anos)
CBCn	16	5	11	76,0 $\pm$ 8,21
CBCs	10	7	3	68,82 $\pm$ 15,14
Total	26	12	14	72,96 $\pm$ 12,18

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; DP: desvio padrão.

Tabela 6 - Características das amostras dos diferentes subtipos do carcinoma basocelular (n=26) submetidas ao estudo

Características	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Tipos Clínicos e Histopatológicos		
CBCn	16	61,54
CBCs	10	38,46
Localização		
Cefálico	12	46,15
Não-cefálico	14	53,85
Total	26	100

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial.

A análise pelo teste exato do χ^2 das variáveis categóricas sexo e subtipo do CBC não apresentou diferença com significância estatística ($p=0,11$). Embora não significativo, nota-se na amostra a prevalência do subtipo superficial no sexo feminino e do nodular no masculino (OR = 5,13; IC95%: 0,92 – 28,57).

As médias e medianas das idades dos dois subtipos de CBC analisados foram respectivamente de 75,13 anos e 75 anos no CBCn e de 69,50 anos e 70,50 anos no CBCs, as quais não apresentaram diferenças estatísticas entre si, segundo o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,617$).

Quanto à localização dos tumores doze eram cefálicos (12/26; 46,15%) e quatorze não-cefálicos (14/26; 53,85%), também não apresentaram diferença estatística significativa pelo teste exato do χ^2 para localização cefálica e não cefálica nos diferentes subtipos do tumor ($p= 0,618$). Em relação à topografia, 84,62% (22/26) dos tumores eram localizados em área fotoexposta (cabeça, pescoço e membros) e 15,38% (4/26) em área coberta (tronco anterior e dorso).

4.2 Imunomarcacão nos fragmentos de subtipos do CBC

Foram realizadas as imunomarcacões dos fragmentos de subtipos do CBC (CBCn e CBCs) com CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF.

A análise histopatológica descritiva e qualitativa dos cortes corados com hematoxilina-eosina (HE) mostrou que os CBCn apresentaram um infiltrado inflamatório mais evidente e concentrado ao redor da neoplasia (Figuras de 5 a 15). Já nos CBCs, o infiltrado inflamatório mostrou-se difusamente distribuído por toda a derme, tornando-se mais denso nas áreas de proximidade da neoplasia. Em ambos os subtipos, o infiltrado inflamatório foi constituído por expressivo número de mastócitos, linfócitos e macrófagos e alguns poucos eosinófilos.

Todas as amostras apresentaram imunomarcacão para os marcadores analisados, CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF. As imunomarcacões foram mais intensas e evidentes no infiltrado inflamatório perineoplásico (PN) em relação à neoplasia.

Frequentemente, a marcação do infiltrado inflamatório PN dérmico estendeu-se até áreas de ausência do tumor. Raramente, foi notada marcação do infiltrado inflamatório dérmico imediatamente abaixo de epiderme normal, no entanto, houve ausência de expressão de todos os marcadores na epiderme normal. A imunomarcacão com o VEGF, foi infrequente no interior das neoplasias e mais evidente e concentrada na área PN, com marcação em mastócitos, linfócitos e células endoteliais de neovasos. A imunomarcacão para VEGF mostrou-se concentrada em áreas com maior densidade do infiltrado PN e de neoformação vascular; e menos intensa em áreas de menor densidade de neovascularização e de escassez do infiltrado inflamatório PN.

Figura 5 - Aspectos histológicos e imunomarcção para CD3 em amostra de CBCn
 (a) Coloração em HE (4X) evidencia formação neoplásica de células basaloides com núcleos em paliçada na periferia, estendendo-se até a derme reticular; (b) HE (10X), infiltrado mononuclear (setas pretas) difuso ao redor da neoplasia; (c) HE (20X), magnificação da neoplasia de células basaloides; (d) HE (40X), imagens de mitoses de células neoplásicas (setas pretas); (e) IHQ CD3 (10X), nota-se a imunomarcção PN; (f) IHQ CD3 (20X), visualização da marcação do linfócitos T peritumorais.

Figura 6 - Aspectos histológicos e imunomarcção para CD3 em amostra de CBCs
 (a) HE (20X), nota-se que o tumor é pigmentado; (b) IHC CD3 (20X), área com melanina e mínima imunomarcção neoplásica; (c) outro campo desse tumor, a marcação por melanina é mais grumosa (setas brancas), e a imunomarcção levede poucas células neoplásicas (setas pretas). Observar como esta última é mais intensa e condensada; (d) IHC CD3 (20X) outro tumor superficial também pigmentado mostrando a diferença entre a melanina (círculo preto) e a imunomarcção das células da neoplasia basaloide(círculo branco).

Figura 7 - Aspectos histológicos e imunomarcção para CD4 em amostras distintas de CBC
(a) HE (20X), visualização dos ninhos neoplásicos de CBCn; (b) IHQ CD4 (20X) observar a imunomarcção do infiltrado PN, sem marcação do epitélio tumoral; (c) IHQ CD4 (10X), tumor superficial, com intensa imunomarcção de infiltrado inflamatório PN.

Figura 8 - Aspectos histológicos e imunomarcção para CD25 em amostras de CBCn (a) HE (10X), pele com intensa elastose solar indicando fotoexposição, presença ninhos de células basaloides em paliçada; (b) HE (20X) magnificação do infiltrado linfomononuclear ao redor da neoplasia; (c) IHQ CD25 (10X) imunomarcção de intensidade moderada nas células neoplásicas, com marcação basicamente das células formadoras da paliçada; (d) IHQ CD25 (20X) visualização também de imunomarcção em infiltrado PN.

Figura 9 - Aspectos histológicos e imunomarcção para CD25 em amostras de CBCs e CBCn
 (a) HE (40X) CBCs rodeado por infiltrado inflamatório discreto; (b) IHQ CD25 (20X) imunomarcção de intensidade moderada na neoplasia e imunoexpressão nos linfócitos do infiltrado PN; (c) HE (4X) tumor nodular com diferenciação cribiforme; (d) IHQ CD25 (10X) imunomarcção leve e moderada de células neoplásicas e assim como do infiltrado inflamatório PN.

Figura 10 -Aspectos histológicos e imunomarcção para HLA-G em amostra de CBCs
 (a) HE (10X) CBCs pigmentado; (b) HE (20X) magnificação com melhor observação da melanina, nota-se sua presença apenas na base da neoplasia;
 (c) IHQ HLA-G (10X) imunomarcção de células neoplásicas de intensidade moderada e acentuada, e infiltrado PN com intensa imunoexpressão; (d) IHQ HLA-G (20X); (e) IHQ HLA-G (40X) coloração em área anteriormente não corada pela melanina, confirmando a imunoexpressão; (f) IHQ HLA-G (40X) detalhe da imunomarcção PN.

Figura 11 -Aspectos histológicos e imunomarcção para HLA-G em amostra de CBCn
 (a) HE (10X) CBCn com intenso infiltrado inflamatório PN; (b) IHQ HLA-G (10X) imunomarcção de células neoplásica e das células do infiltrado PN; (c) IHQ HLA-G (40X) magnificação da imunomarcção citoplasmática de células neoplásica de intensidade moderada e acentuada; (d) IHQ HLA-G (40X) melhor visualização da imunomarcção PN.

Figura 12 -Aspectos histológicos e imunomarcção para HLA-G em amostras de CBCs (a) HE (10X) CBCs infiltrativo com discreto infiltrado inflamatório PN; (b) IHC HLA-G (10X) imunomarcção neoplásica e PN; (c) IHC HLA-G (20X) magnificação da imunomarcção de células neoplásicas de intensidade leve (círculo preto) e moderada (círculos brancos); (d) IHC HLA-G (40X) melhor visualização da imunomarcção PN, com marcação de macrófagos (setas brancas) e marcação de linfócitos (setas pretas); (e) HE (20X) Foco de tumor superficial, com infiltrado inflamatório ao redor do ninho tumoral; (f) IHC (20X) Imunomarcção leve de células neoplásicas em alguns focos e imunomarcção mais evidente no PN.

Figura 13 -Aspectos histológicos e imunomarcção em amostra de CBCn

(a) HE (4X) CBCn com transformação cribiforme; (b) IHQ HLA-G (20X) não há imunomarcção de células neoplásicas e do infiltrado linfocítico nessa porção tumoral; (c) IHQ FOXP3 (20X) imunomarcção de células neoplásicas de intensidade leve; (d) IHQ FOXP3 (20X) intensa imunomarcção PN; (e) IHQ FOXP3 (10X) imunomarcção leve de células neoplásicas e evidente de PN; (f) IHQ CD4 (10X) imunomarcção PN; (g) HE (4X) porção sem transformação cribiforme da mesmaneoplasia; (h) IHQ HLA-G (20X) nessa área há imunomarcção de células neoplásica de intensidade leve e PN discreta.

Figura 14 -Aspectos histológicos e imunomarcção de FOXP3 em amostra de CBCn
 (a) HE (4X) CBCn com ulceração central; (b) HE (10X) detalhe do ninho de células neoplásicas abaixo da ulceração; (c) HE (20X) tumor nodular circunscrito por intenso infiltrado inflamatório PN; (d) IHQ FOXP3 (20X) imunomarcção citoplasmática de células neoplásicas de intensidade leve e imunoexpressão no infiltrado inflamatório linfocitário; (e) HE (4X) outro tumor nodular este já com infiltrado inflamatório mais discreto que o anterior; (f) IHQ FOXP3 (20X) imunomarcção leve de células neoplásicas e imunoexpressãoPN mais discreta que o caso anterior.

Figura 15 - Aspectos histológicos e imunomarcção para VEGF de em amostras de CBCs e CBCn
 (a) HE (10X) CBCs; (b) IHQ VEGF (20X) ausência de imunomarcção na neoplasia e no infiltrado perineoplásico; (c) IHQ VEGF (20X) imunomarcção de infiltrado PN; (d) IHQ VEGF (40X) imunomarcção de neovasos em CBCn.

Seguida a análise histopatológica qualitativa das lâminas, foram avaliadas as frequências de positividade de imunomarcacão das células neoplásicas e do infiltrado PN. Quando presente a imunomarcacão das células neoplásicas, foram registradas as frequências de imunomarcacão em cada intensidade de impregnação (leve, moderada ou acentuada) pelo marcador, e os achados estão descritos nas tabelas 7, 8, 9, 10, 11, e 12.

Para o marcador VEGF, além da frequência de positividade de imunomarcacão na neoplasia e no infiltrado PN, procedeu-se ainda a avaliação da intensidade de marcação na neoangiogênese PN, conforme descrito na tabela 13.

Tabela 7 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas (Cneo) nas variadas intensidades para CD3 em carcinomas basocelulares (n=26)

Subtipo	Imunomarcção de Cneo (CD3)				Imunomarcção infiltrado PN (%)
	Imunomarcção de Cneo	Intensidade leve (%)	Intensidade moderada (%)	Intensidade acentuada (%)	
CBCs	S	10	-	-	40
CBCs	S	50	-	-	50
CBCs	N	-	-	-	80
CBCs	S	30	-	-	90
CBCs	S	30	-	-	70
CBCs	S	20	-	-	70
CBCs	S	20	-	-	60
CBCs	S	10	-	-	80
CBCs	N	-	-	-	80
CBCs	N	-	-	-	80
CBCn	S	20	-	-	70
CBCn	N	-	-	-	50
CBCn	S	20	-	-	60
CBCn	S	20	-	-	60
CBCn	S	10	-	-	70
CBCn	N	-	-	-	40
CBCn	N	-	-	-	50
CBCn	S	20	-	-	60
CBCn	S	20	-	-	70
CBCn	S	10	-	-	70
CBCn	N	-	-	-	50
CBCn	S	10	-	-	90
CBCn	S	40	-	-	80
CBCn	S	40	10	-	90
CBCn	S	60	-	-	60
CBCn	S	10	-	-	50

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; Cneo: células neoplásicas; S: sim; N: não; -: sem marcação.

Tabela 8 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para CD4 em carcinomas basocelulares (n=26)

Subtipo	Imunomarcção de Cneo (CD4)				Imunomarcção infiltrado PN (%)
	Imunomarcção de Cneo	Intensidade leve (%)	Intensidade moderada (%)	Intensidade acentuada (%)	
CBCs	N	-	-	-	20
CBCs	S	30	-	-	20
CBCs	S	10	10	-	60
CBCs	N	-	-	-	10
CBCs	N	-	-	-	10
CBCs	S	10	-	-	20
CBCs	S	10	-	-	40
CBCs	N	-	-	-	20
CBCs	S	10	-	-	40
CBCs	N	-	-	-	20
CBCn	S	10	-	-	10
CBCn	S	10	-	-	20
CBCn	S	10	-	-	30
CBCn	S	10	-	-	40
CBCn	N	-	-	-	20
CBCn	N	-	-	-	10
CBCn	N	-	-	-	10
CBCn	S	5	-	-	20
CBCn	N	-	-	-	30
CBCn	N	-	-	-	20
CBCn	S	10	-	-	30
CBCn	S	30	-	-	40
CBCn	S	10	-	-	40
CBCn	N	-	-	-	20
CBCn	N	-	-	-	30
CBCn	N	-	-	-	10

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; Cneo: células neoplásicas; S: sim; N: não; -: sem marcação.

Tabela 9 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para CD25 em carcinomas basocelulares (n=26)

Subtipo	Imunomarcção de Cneo(CD25)				Imunomarcção infiltrado PN (%)
	Imunomarcção de Cneo	Intensidade leve (%)	Intensidade moderada (%)	Intensidade acentuada (%)	
CBCs	S	10	-	-	40
CBCs	S	30	-	-	40
CBCs	N	-	-	-	40
CBCs	S	30	10	-	40
CBCs	S	30	-	-	50
CBCs	S	40	10	-	40
CBCs	S	20	-	-	40
CBCs	S	10	-	-	70
CBCs	S	30	20	-	70
CBCs	S	10	-	-	40
CBCn	S	30	-	-	40
CBCn	S	10	-	-	20
CBCn	S	20	-	-	40
CBCn	S	30	10	-	60
CBCn	S	10	-	-	30
CBCn	S	30	-	-	20
CBCn	S	40	-	-	50
CBCn	S	60	-	-	70
CBCn	S	20	-	-	40
CBCn	S	-	20	-	50
CBCn	S	20	-	-	40
CBCn	S	60	-	-	50
CBCn	S	-	80	-	80
CBCn	S	20	10	-	30
CBCn	S	40	10	-	60
CBCn	S	20	-	-	40

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; Cneo: células neoplásicas; S: sim; N: não; -: sem marcação.

Tabela 10 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para FOXP3em carcinomas basocelulares (n=26)

Subtipo	Imunomarcção de Cneo(FOXP3)				Imunomarcção infiltrado PN (%)
	Imunomarcção de Cneo	Intensidade leve (%)	Intensidade moderada (%)	Intensidade acentuada (%)	
CBCs	N	-	-	-	10
CBCs	S	10	-	-	10
CBCs	S	20	-	-	40
CBCs	N	-	-	-	20
CBCs	S	30	-	-	30
CBCs	S	10	-	-	10
CBCs	S	10	-	-	30
CBCs	S	10	-	-	20
CBCs	S	10	-	-	30
CBCs	S	-	60	-	60
CBCn	S	30	-	-	30
CBCn	S	50	-	-	40
CBCn	S	20	-	-	10
CBCn	N	-	-	-	10
CBCn	S	10	-	-	20
CBCn	S	20	-	-	20
CBCn	S	10	-	-	20
CBCn	N	-	-	-	0
CBCn	S	30	-	-	20
CBCn	S	50	-	-	40
CBCn	S	40	-	-	30
CBCn	S	20	-	-	10
CBCn	S	10	-	-	40
CBCn	S	30	-	-	80
CBCn	S	40	-	-	40
CBCn	S	10	-	-	10

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; Cneo: células neoplásicas; S: sim; N: não; -: sem marcação.

Tabela 11 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades para HLA-G em carcinomas basocelulares (n=26)

Subtipo	Imunomarcção de Cneo (HLA-G)				Imunomarcção infiltrado PN (%)
	Imunomarcção de Cneo	Intensidade leve (%)	Intensidade moderada (%)	Intensidade acentuada (%)	
CBCs	S	10	-	-	40
CBCs	S	10	60	20	90
CBCs	S	5	-	-	10
CBCs	S	40	-	-	40
CBCs	S	60	20	-	40
CBCs	S	40	40	-	60
CBCs	S	5	-	-	10
CBCs	S	30	-	-	70
CBCs	S	40	30	-	60
CBCs	S	60	-	-	40
CBCn	S	50	30	-	40
CBCn	S	70	-	-	30
CBCn	S	50	20	-	70
CBCn	S	40	30	10	80
CBCn	S	40	20	-	70
CBCn	S	30	40	10	50
CBCn	S	50	20	-	50
CBCn	S	40	30	20	70
CBCn	S	30	40	10	40
CBCn	S	40	30	-	60
CBCn	S	60	30	-	50
CBCn	S	40	20	-	60
CBCn	S	30	40	-	60
CBCn	S	40	50	-	70
CBCn	S	40	30	-	70
CBCn	S	40	30	10	70

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; Cneo: células neoplásicas; S: sim; N: não; -: sem marcação.

Tabela 12 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) e de células neoplásicas(Cneo) nas variadas intensidades paraVEGF em carcinomas basocelulares (n=26)

Subtipo	Imunomarcção de Cneo(VEGF)				Imunomarcção infiltrado PN (%)
	Imunomarcção de Cneo	Intensidade leve (%)	Intensidade moderada (%)	Intensidade acentuada (%)	
CBCs	N	-	-	-	60
CBCs	S	10	-	-	70
CBCs	N	-	-	-	10
CBCs	N	-	-	-	20
CBCs	N	-	-	-	40
CBCs	N	-	-	-	10
CBCs	N	-	-	-	15
CBCs	N	-	-	-	40
CBCs	N	-	-	-	70
CBCs	N	-	-	-	10
CBCn	N	-	-	-	20
CBCn	N	-	-	-	40
CBCn	S	30	-	-	0
CBCn	N	-	-	-	50
CBCn	N	-	-	-	20
CBCn	N	-	-	-	40
CBCn	S	30	-	-	80
CBCn	N	-	-	-	40
CBCn	N	-	-	-	10
CBCn	S	40	20	-	60
CBCn	N	-	-	-	30
CBCn	S	50	10	-	70
CBCn	N	-	-	-	10
CBCn	N	-	-	-	80
CBCn	S	10	-	-	40
CBCn	N	-	-	-	20

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; Cneo: células neoplásicas; S: sim; N: não; -: sem marcação.

Tabela 13 - Frequência de imunomarcção dos neovasos perineoplásicos(PN)para VEGF em carcinomas basocelulares (n=26)

Subtipo	Neoangiogênese PN (%)
CBCs	70
CBCs	50
CBCs	70
CBCs	20
CBCs	20
CBCs	50
CBCs	30
CBCs	15
CBCs	50
CBCs	30
CBCn	40
CBCn	70
CBCn	70
CBCn	30
CBCn	50
CBCn	60
CBCn	40
CBCn	10
CBCn	80
CBCn	40
CBCn	70
CBCn	30
CBCn	80
CBCn	60
CBCn	70
CBCn	50
p=	0,14

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; Teste de Mann-Whitney.

4.2.1 Análise da imunomarcção de células neoplásicas (Cneo)

A análise da imunomarcção de Cneo para os diversos marcadores CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF não mostrou diferença estatística significativa para os diferentes subtipos do CBC (tabela 14).

Tabela 14 - Análise por meio do teste exato do χ^2 da imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) com CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF nos diferentes subtipos do carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção	CBCs n (%)	CBCn n (%)	Total n (%)	P	OR	IC95%
CD3						
Sim	7 (70)	12 (75)	19 (73,1)	1,00	1,29	0,22-7,50
Não	3 (30)	4 (12)	7 (26,9)			
CD4						
Sim	5 (50)	8 (50)	13 (50)	1,00	1,00	0,21-4,86
Não	5 (50)	8 (50)	13 (50)			
CD25						
Sim	9 (90)	16 (100)	25(96,2)	0,39	0,19	0,007- 5,19
Não	1 (10)	0 (0)	1 (3,8)			
FOXP3						
Sim	8 (80)	14 (87,5)	22 (84,62)	0,61	0,57	0,06 – 4,87
Não	2 (20)	2 (12,5)	4 (15,38)			
HLA-G						
Sim	10 (100)	16 (100)	26 (100)	-	-	-
Não	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
VEGF						
Sim	1 (10)	5 (31,3)	6 (23,1)	0,35	4,09	0,40 – 41,66
Não	9 (90)	11 (68,8)	20 (76,9)			
Total (n)	10	16	26 (100)			

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

O HLA-G foi o único que apresentou imunomarcção de Cneo em todas as amostras. A avaliação da imunomarcção de Cneo quanto a topografia dos tumores também não apresentou diferença estatística significativa (tabela 15).

A imunomarcção de Cneo para VEGF foi observada apenas em 23,1% dos CBC, em sua maioria de nodulares (31,3%; 5/16), e rara no CBCs (10%; 1/10). A expressiva maioria dos CBC não expressou VEGF (76,9%; 20/26) no seu interior.

Tabela 15 - Análise por meio do teste exato do χ^2 da imunomarcagem de células neoplásicas(Cneo) com CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF, segundo localização do carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcacão	CEF n(%)	NCEF n(%)	Total n(%)	P	OR	IC95%
CD3						
Sim	8 (66,67)	11 (78,57)	19 (73,07)	0,50	0,55	0,09 - 3,15
Não	4 (33,33)	3 (21,43)	7 (26,92)			
CD4						
Sim	4 (33,33)	9 (64,28)	13 (50)	0,12	0,278	0,05 – 1,41
Não	8 (66,67)	5 (35,72)	13 (50)			
CD25						
Sim	11 (91,67)	14 (100)	25 (96,15)	0,43	0,26	0,00 – 7,12
Não	1 (8,33)	0 (0)	1 (3,85)			
FOXP3						
Sim	11 (91,67)	11 (78,57)	22 (84,62)	0,37	3,00	0,27 – 33,49
Não	1 (8,33)	3 (21,43)	4 (15,38)			
HLA-G						
Sim	12 (100)	14 (100)	26 (100)	0,91	0,79	0,01 - 43,12
Não	0	0 (0)	0 (0)			
VEGF						
Sim	3 (25)	3 (21,43)	6 (23,08)	0,83	1,22	0,20 – 7,59
Não	9 (75)	11 (78,57)	20 (76,92)			
Total (n)	12 (46,15)	14 (53,85)	26 (100)			

Legenda: CEF: cefálico; NCEF: não cefálico; Cneo: células neoplásicas; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança.

Em seguida, foram comparadas as porcentagens de Cneo marcadas em **intensidade leve, moderada ou acentuada** por CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF nos diferentes subtipos analisados do CBC. Para avaliação estatística, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A imunomarcagem de Cneo em **intensidade leve** foi evidenciada com os marcadores CD3, CD4, CD25, HLA-G e VEGF, no entanto a comparação das porcentagens não indicou diferenças estatísticas significantes entre os subtipos tumorais, como pode ser observado nas tabelas 16, 17, 18, 19, 20 e 21. Já a imunomarcagem com o FOXP3 indicou que os CBCn apresentaram maior

porcentagem de Cneo imunomarcadas de **intensidade leve** quando comparados aos CBCs ($p = 0,037$).

Tabela 16 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidade leve** para CD3 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção de Cneo em intensidade leve (CD3) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem marcação	3 (30)	4 (25)
10	2 (20)	4 (25)
20	2 (20)	5 (31,25)
30	2 (20)	-
40	-	2 (12,5)
50	1 (10)	-
60	-	1 (6,25)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcção±DP(%)	24±13	23±15

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney $p=0,67$.**

Tabela 17 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidade leve** para CD4 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção de Cneo em intensidade leve (CD4) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem marcação	5 (50)	8 (50)
5	-	1 (6,25)
10	4 (40)	6 (37,5)
30	1 (10)	1 (6,25)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcção±DP(%)	14±8	12±7

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney $p=0,84$.**

Tabela 18 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidade leve** para CD25 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção de Cneo em intensidade leve (CD25) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem marcação	1 (10)	2 (12,5)
10	3 (30)	2 (12,5)
20	1 (10)	5 (31,25)
30	4 (40)	3 (18,75)
40	1 (10)	2 (12,5)
60	-	2 (12,5)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcção±DP(%)	23±11	29±15

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney p=0,42**.

Tabela 19 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidade leve** para FOXP3 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção de Cneo em intensidade leve (FOXP3) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem marcação	3 (30)	2 (12,5)
10	5 (50)	4 (25)
20	1 (10)	3 (18,75)
30	1 (10)	3 (18,75)
40	-	2 (12,5)
50	-	2 (12,5)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcção±DP(%)	14±7	26±14

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney p=0,037***.

Tabela 20 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidade leve** para HLA-G nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção de Cneo em intensidade leve (HLA-G) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
5	2 (20)	-
10	2 (20)	-
30	1 (10)	3 (18,75)
40	3 (30)	8 (50)
50	-	3 (18,75)
60	2 (20)	1 (6,25)
70	-	1 (6,25)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcção±DP(%)	33±20	43±10

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney p=0,22.**

Tabela 21 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidade leve** para VEGF nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção de Cneo em intensidade leve (VEGF) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem marcação	9 (90)	11 (68,75)
10%	1 (10)	1 (6,25)
30%	-	2 (12,5)
40%	-	1 (6,25)
50%	-	1 (6,25)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcção±DP(%)	10±0	32±13

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney p=0,18.**

A imunomarcção de Cneo em **intensidade moderada** foi evidenciada com todos os marcadores. No entanto, para CD3, CD4, FOXP3 e VEGF houve escasso número de amostras com a marcação nesta intensidade, não sendo possível a análise estatística para tal comparação (Tabela 22). Houve marcação de **intensidademoderada** com CD3 em 10% das células tumorais em apenas um

CBCn; com CD4, a marcação em 10% em um CBCs; com VEGF, duas marcações, uma de 10% e outra de 20% ambas em CBCn, não marcando em nenhum dos CBCs; e o FOXP3, uma única marcação de 60% em um CBCs. A comparação das porcentagens de marcação para CD25 das células tumorais em **intensidademoderada** não indicou diferença estatística significativa entre os subtipos do CBCn e CBCs.

Tabela 22 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidademoderada** para CD3, CD4, FOXP3 e VEGF nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Marcador	Subtipo	Porcentagem de imunomarcção de Cneo em intensidade moderada				Total (n)
		Sem imunomarcção (n)	10% (n)	20% (n)	60% (n)	
CD3	CBCn	15	1	-	-	16
	CBCs	10	-	-	-	10
CD4	CBCn	16	-	-	-	16
	CBCs	9	1	-	-	10
FOXP3	CBCn	15	-	-	1	16
	CBCs	10	-	-	-	10
VEGF	CBCn	14	1	1	-	16
	CBCs	10	-	-	-	10

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas.

Para o marcador CD25, a comparação das porcentagens de imunomarcção de células neoplásicas em **intensidade moderada** não indicou diferença estatística significativa entre os subtipos do CBCn e CBCs (Tabela 23). Para o marcador HLA-G, as porcentagens das células neoplásicas marcadas com **intensidademoderada** foram significativamente maiores ($p=0,04$) nos CBCn comparadas aos CBCs (tabela 24).

Tabela 23 - Frequência de imunomarcacão de células neoplásicas(Cneo) em **intensidademoderada** para CD25 nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcacão de Cneo em intensidade moderada (CD25) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem imunomarcacão	7 (70)	11 (68,75)
10	2 (20)	3 (18,75)
20	1 (10)	1 (6,25)
80	-	1 (6,25)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcacão±DP(%)	13±5	26±27

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney p=0,27**.

Tabela 24 - Frequência de imunomarcacão de células neoplásicas(Cneo) em **intensidademoderada** para HLA-G nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcacão de Cneo em intensidade moderada (HLA-G) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem imunomarcacão	6 (60)	1 (6,25)
20	1 (10)	4 (25)
30	1 (10)	7 (43,75)
40	1 (10)	3 (18,75)
50	-	1 (6,25)
60	1 (10)	-
Total (n)	10	16
Média de imunomarcacão±DP(%)	38±15	31±9

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney p=0,04***.

No estudo, somente o marcador HLA-G apresentou marcação de **intensidade acentuada**, porém não houve diferença estatística entre os subtipos tumorais para essa intensidade de marcação de células neoplásicas (tabela 25).

Tabela 25 - Frequência de imunomarcção de células neoplásicas(Cneo) em **intensidade acentuada** para HLA-G nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Imunomarcção de Cneo em intensidade acentuada (HLA-G) (%)	CBCs n(%)	CBCn n(%)
Sem imunomarcção	9 (90)	11 (68,75)
10	-	4 (25)
20	1 (10)	1 (6,25)
Total (n)	10	16
Média de imunomarcção±DP(%)	20±0	12±4

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cneo: células neoplásicas; DP: Desvio padrão; **Teste de Mann-Whitney p=0,34.**

4.2.2 Análise da imunomarcção perineoplásica (PN)

A imunomarcção PN foi mais evidente que a de Cneo, e ocorreu prioritariamente no infiltrado que se encontrava ao redor dessas células. O infiltrado inflamatório dérmico abaixo de epiderme normal praticamente não apresentou marcação. A média de imunomarcção PN e o desvio padrão para cada marcador estão descritos na tabela 26.

Tabela 26 – Porcentagem média e desvio padrão para imunomarcção perineoplásica (PN) para CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF de diferentes subtipos e topografias do carcinoma basocelular (n=26)

	Infiltração PN					
	CD3	CD4	CD25	FOXP3	HLA-G	VEGF
CBCs						
Média (%)	70	26	47	26	50	34,5
DP (%)	14,83	14,97	11,87	14,97	21,60	23,71
CBCn						
Média (%)	63,75	23,75	45	26,25	58,75	38,125
DP (%)	14,09	10,53	16,20	18,67	13,64	24,04
CEF						
Média (%)	63,33	20,00	42,50	23,33	56,36	38,33
DP (%)	12,47	13,54	11,64	13,12	16,11	21,15
NCEF						
Média (%)	68,57	28,57	48,57	28,57	55,00	34,64
DP (%)	15,97	9,90	16,41	19,95	18,42	24,38

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; CEF: cefálico; NCEF: não-cefálico; PN: perineoplásica; DP: Desvio Padrão.

As porcentagens de imunomarcção PN com CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF foram comparadas nos diferentes subtipos analisados do CBC e para as diferentes localizações, cefálica e não-cefálica (tabelas 27 e 28). O teste utilizado para avaliação estatística também foi o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não houve diferença estatística significativa entre as porcentagens de células imunomarcadas para todos os marcadores nos diferentes subtipostumorais. Na avaliação da imunomarcção quanto à topografia, o marcador CD4 mostrou-se significativamente mais frequente nos tumores não-cefálicos ($p=0,02$).

A imunomarcção PN para VEGF foi evidenciada em 96,1% (25/26) dos CBC. A porcentagem média de marcação foi de 36,7% para os componentes celulares do infiltrado e de 48,3% para componentes celulares de neovasos.

Tabela 27 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) nos diferentes subtipos de carcinoma basocelular (n=26)

Subtipo	Infiltração PN (%)					
	CD3	CD4	CD25	FOXP3	HLA-G	VEGF
CBCs	40	20	40	10	40	60
CBCs	50	20	40	10	90	70
CBCs	80	60	40	40	-	10
CBCs	90	10	40	20	40	20
CBCs	70	10	50	30	40	40
CBCs	70	20	40	10	60	10
CBCs	60	40	40	30	10	15
CBCs	80	20	70	20	70	40
CBCs	80	40	70	30	60	70
CBCs	80	20	40	60	40	10
CBCn	70	10	40	30	40	20
CBCn	50	20	20	40	30	40
CBCn	60	30	40	10	70	0
CBCn	60	40	60	10	80	50
CBCn	70	20	30	20	70	20
CBCn	40	10	20	20	50	40
CBCn	50	10	50	20	50	80
CBCn	60	20	70	0	70	40
CBCn	70	30	40	20	40	10
CBCn	70	20	50	40	60	60
CBCn	50	30	40	30	50	30
CBCn	90	40	50	10	60	70
CBCn	80	40	80	40	60	10
CBCn	90	20	30	80	70	80
CBCn	60	30	60	40	70	40
CBCn	50	10	40	10	70	20
p=	0,26	0,93	0,79	0,97	0,24	0,65

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; PN: perineoplásica; p: Teste de Mann-Whitney.

Tabela 28 - Frequência de imunomarcção perineoplásica (PN) para as topografias cefálicas e não-cefálicas de carcinoma basocelular (n=26)

Topografia	Infiltração PN (%)					
	CD3	CD4	CD25	FOXP3	HLA-G	VEGF
NCEF	40	20	40	10	40	60
NCEF	60	40	60	20	80	0
NCEF	90	10	40	20	40	10
NCEF	70	20	40	10	60	40
NCEF	60	30	40	40	60	30
NCEF	80	40	40	30	10	10
NCEF	50	40	50	80	50	60
NCEF	80	20	70	20	70	15
NCEF	90	40	80	40	60	70
NCEF	80	20	30	10	70	10
NCEF	90	40	70	60	60	40
NCEF	60	30	60	30	70	80
NCEF	50	20	20	10	30	20
NCEF	60	30	40	20	70	40
CEF	50	20	40	10	90	30
CEF	80	60	40	40	-	70
CEF	70	20	30	20	70	50
CEF	40	10	20	0	50	20
CEF	50	10	50	20	50	40
CEF	60	20	70	40	70	80
CEF	70	30	40	30	40	40
CEF	70	10	50	30	40	20
CEF	70	20	50	10	60	10
CEF	50	10	40	40	70	40
CEF	80	20	40	30	40	10
CEF	70	10	40	10	40	50
p=	0,42	0,02*	0,45	0,77	0,93	0,62

Legenda: CEF: cefálico; NCEF: não-cefálico; PN: perineoplásica; p: Teste de Mann-Whitney;

*: p<0,05.

4.3 Expressão de citocinas nos subtipos de CBC

Por meio da qPCR, foi analisada a expressão comparativa das citocinas IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17 e IL-23, IFN- γ e FOXP3 nos fragmentos dos subtipos de CBC e da pele normal (Gráficos 1 e 2; APÊNDICES B e C). Na análise, tanto os tumores nodulares como os superficiais apresentaram maior expressão das citocinas IL-6, IL-8 e IL-17; e menor expressão da IL-4 em relação à pele normal. A expressão de IL-10 não mostrou diferenças entre os tumores e a pele normal, mas um elevado desvio padrão. A expressão de IL-23 foi próxima à da pele normal no CBCn e reduzida no CBCs. A expressão de IFN- γ foi semelhante à da pele normal no CBCs, e discretamente aumentada no CBCn. Já a expressão do FOXP3 foi aumentada no CBCs e reduzida no CBCn, quando comparada à pele normal.

Gráfico 1 – Média ± Desvio padrão da expressão relativa de mRNA em amostra de pele normal, CBCn e CBCs

Os transcritos de mRNA para as citocinas (a) IL-4, (b) IL-6, (c) IL-8 e (d) IL-10 foram determinados por qPCR normalizados para o gene de referência β -actina. Os valores de C_q foram analisados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_q}$, como descrito em casuística e métodos, no qual o valor 1 (tracejado) foi adotado como referencial relativo a pele normal. Os dados foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney com $p=0,88$; $p=0,68$; $p=0,97$ e $p=0,61$ respectivamente.

Gráfico 2 - Média $\pm$ Desvio padrão da expressão relativa de mRNA em amostra de pele normal, CBCn e CBCs

Os transcritos de mRNA para as citocinas (a) IL-17, (b) IL-23, (c) IFN- γ e (d) FOXP3 foram determinados por qPCR normalizados para o gene de referência β -actina. Os valores de C_q foram analisados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_q}$, como descrito nos materiais e métodos, no qual o valor 1 (tracejado) foi adotado como referencial relativo a pele normal. Os dados foram analisados pelo Teste de Mann-Whitney com $p=0,43$; $p=0,06$; $p=0,78$ e $p=0,06$ respectivamente.

Considerando-se as duas localizações estudadas, cefálica e não-cefálica, na análise dos valores do $2^{-\Delta\Delta C_q}$ das amostras de CBC, notou-se maior expressão de IL-4 nos tumores cefálicos ($p=0,02$), e de IL-8 naqueles não-cefálicos ($p=0,002$), como mostra o Gráfico 3.

Gráfico 3 – Expressão relativa de mRNA por amostra de CBC de localização cefálica (a) e não-cefálica (b)

O valor 1 (tracejado) foi adotado como referencial, onde acima indica estimulação e abaixo indica supressão do gene. Teste de Mann-Whitney $p=0,02^*$; $p=0,08$; $p=0,002^*$; $p=0,25$; $p=0,31$; $p=0,53$; $p=0,58$; $p=0,83$ para cada marcador respectivamente.

A análise do coeficiente de correlação não paramétrico de Spearman mostrou ausência de correlação entre a expressão de IL-6 e IL-8 nos CBCs ($r=0,09$; $p=0,81$), CBCn ($r=0,16$; $p=0,55$), CBC cefálicos ($r=-0,04$; $p=0,90$) e CBC não-cefálicos ($r=0,62$; $p=0,06$). Houve correlação positiva entre a expressão de IL-10 e IFN- γ nos CBCs ($r=0,71$; $p=0,03$), CBCn ($r=0,57$; $p=0,03$) e CBC cefálicos ($r=0,76$; $p=0,022$); e ausência de correlação entre essas citocinas nos CBC não-cefálicos ($r=0,48$; $p=0,17$).

5 DISCUSSÃO

Desde a primeira descrição do CBC por Jacob em 1827, sua incidência vem progressivamente aumentando (Armstrong; Krickler, 1995; Staples et al., 2006; Jemal et al., 2008), sendo que a estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para 2012 foi de 93.919 casos novos (INCA, 2008). Para 2014 espera-se 182.000 casos novos de câncer de pele não melanoma, sendo o CBC responsável por 70% deles, segundo dados do Ministério da Saúde e INCA (INCA, 2014).

Devido a sua relevância epidemiológica, se desperta o interesse no entendimento do comportamento clínico, evolutivo e imunológico do CBC. A avaliação dos mecanismos envolvidos no microambiente tumoral pode permitir o desenvolvimento de novas ferramentas de prevenção e tratamento.

A amostra desse estudo compreendeu análise de fragmentos de CBC sem diferenças significantes entre gênero, mas discretamente maior de homens (54%) em relação a mulheres (46%). Há dados da literatura indicando maior prevalência de CBC em homens (Miller et al., 1994; Gallagher et al., 1990; Karagas et al., 1999; Chinem e Miot, 2011; Jurciukonyte, 2013), no entanto, alguns estudos tem demonstrado que essa proporção está se alterando, tendo as mulheres maior risco de desenvolvimento do CBC (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2006; Lear et al., 2007; Andrade et al., 2012). Acredita-se que este aumento da incidência em mulheres ocorra pela procura mais frequente e precoce dos cuidados dermatológicos (Miller et al., 1996), mas também devido às condições de igualdade de trabalho, exposição à RUV natural ou artificial, câmaras de bronzamento (Karagas et al., 2002) e das atividades de lazer e esportivas com maior fotoexposição (Chinem; Miot, 2011).

Como a literatura ainda é controversa nesse aspecto, mais estudos epidemiológicos são necessários, com amostragem mais ampla e variada, a fim de elucidar as relações entre os padrões de exposição solar, sexo, idade de surgimento das lesões, subtipos histológicos e a agressividade do CBC.

O CBC ocorre tipicamente a partir da quarta década de vida (Goldberg, 1996), porém em algumas genodermatoses específicas (Síndrome do nevo basocelular, Síndrome de Bazex, Síndrome de Rombo, Xeroderma

Pigmentoso, etc.) e em outros transtornos da imunidade (imunossupressão por transplantes, infecção pelo vírus HIV, etc.), o aparecimento do tumor pode ser mais precoce (Price et al., 1994).

Bastiaens et al. (1998) demonstraram que 64,26% dos indivíduos com CBC tinham de 60 a 90 anos. Custódio et al. (2010) descreveram que 43,4% dos CBC analisados ocorreram entre indivíduos de 61 a 80 anos. Já Andrade et al. (2012) relataram uma porcentagem ainda maior, com 80,2% de indivíduos acima dos 70 anos com diagnóstico de CBC. Nossos resultados foram compatíveis com a literatura, observando-se que 69,23% dos tumores ocorreram principalmente após a sétima década de vida, apesar de haver casos diagnosticados antes dos 40 anos de idade.

Bastiaens et al. (1998) observaram que o CBC nodular acometeu significativamente mais homens, enquanto os superficiais apresentaram predisposição para mulheres. Scrivener et al. (2002) avaliaram 13.457 tumores com diagnóstico de CBC, e relataram que os homens apresentaram mais CBC nodulares em relação às mulheres (79,9% versus 77,5%, respectivamente). O *odds ratio* masculino/feminino foi 1,02 nos nodulares, 0,96 nos superficiais e 0,73 nos esclerodermiformes. Em concordância, nossa análise sugere que os homens apresentem tendência, não estatisticamente significativa, para CBC nodular enquanto as mulheres, para o CBC superficial. Por outro lado, Mantese et al. (2006) não encontraram relação entre um determinado tipo histológico e o sexo.

A análise da nossa amostra demonstrou que 84,62% dos tumores eram provenientes de áreas fotoexpostas, algo superior àquela observada por Andrade et al. (2012), 68,8% dos tumores localizados em área fotoexposta, corroborando a associação entre essa neoplasia e a radiação UV cumulativa (Gailani et al., 1996).

Uma das funções biológicas mais importante da RUV é a supressão da resposta imune celular antitumoral (Urbach, 1997). Várias hipóteses são aventadas para justificar a relação da RUV com o CBC, entre elas a de que os raios UV geram mutações no gene p53 (descritos em 40 a 50% dos casos de CBC). Os raios UVB são absorvidos pelas bases dos ácidos nucleicos, criando uma ligação entre pirimidinas adjacentes de uma mesma fita do DNA (fotodímeros), que geram distorções estruturais. A radiação UVB gera mutações

de proto-oncogenes da família RAS, assim como mutações nos genes supressores de tumor *Patched 1* (PNCH1 gene) e p53. (Ratner et al., 2001).

Já a ação da radiação UVA é indireta, pela formação de espécies reativas de oxigênio, que vão interagir com o DNA levando a quebra de sua fitas ou de ligações de proteína e DNA (Setlow; Carrier, 1996).

Filipowicz e colaboradores (2002) descreveram um aumento na regulação de Fas em queratinócitos fotoexpostos, indicando este ser um importante fator protetor nas lesões fotoinduzidas. No entanto, os autores observaram que a cronicidade da exposição gerava uma diminuição da regulação desse mecanismo de defesa, reduzindo a expressão Fas-Fas ligante, tornando as células resistentes a apoptose. Essa alteração regulatória foi proporcional aos graus de displasias encontrados.

Corrêa et al. (2009) analisaram a expressão dos marcadores de apoptose (p53 e Bcl-2) a fim de correlacioná-los com os indicadores histológicos de gravidade do tumor. Ao analisarem cinco amostras dos subtipos nodular, superficial e esclerodermiforme do CBC e compararem com três pacientes livres de lesão, esses autores verificaram uma marcação expressiva para Bcl-2 nas variantes agressivas (esclerodermiforme e nodular), assim como uma marcação de 66,7% dos tumores para o marcador p53, mostrando uma tendência para diagnosticar agressividade do tumor.

A ação do sistema imune na patogenia do CBC ganhou atenção com as observações de que pacientes transplantados renais em uso de imunossupressores apresentavam um aumento da incidência de tumores cutâneos não-melanoma (Euvrard et al., 1995). Devemos considerar também que o principal fator de risco para o desenvolvimento do CBC, a RUV, tem importante influência na imunidade local e sistêmica. Yoshikawa (1990) e Amerio (2001) e seus respectivos colaboradores avaliaram a ação da RUV no desenvolvimento da reação de hipersensibilidade tardia e observaram que aqueles que foram fotoexpostos apresentaram uma resposta imune insatisfatória em contato com substâncias sensibilizadoras. Acredita-se que as alterações sofridas pelas CL secundárias à ação da RUV sejam um dos mecanismos dessa imunossupressão prejudicando a capacidade dessas células apresentarem antígenos aos linfócitos Th (Amerio et al., 2001).

A RUV também estimula os queratinócitos a produzirem citocinas que aumentam a atividade das células T supressoras, tais como o fator de TNF e a IL-10 (Gaspari; Sauder, 2010).

A inabilidade de controlar o crescimento tumoral ocorre por uma ativação incompleta ou inadequada da célula T tumor-específica. A resposta antitumoral citotóxica baseia-se no fato de que a maioria dos tumores apresentam MHC I, mas a ausência de expressão de moléculas MHC II. Os linfócitos citotóxicos são capazes de destruir a célula tumoral, porém essa resposta só se torna duradoura na presença dos linfócitos Th (Ossendorp et al., 2000).

Embora a resposta imune humana contra o CBC não seja capaz de eliminá-lo, tanto a imunidade inata quanto a adquirida têm seu papel na vigilância contra tumores. A interação entre linfócitos T e APC, assim como a relação entre linfócitos T citotóxicos (Tc) e T auxiliares (Th), além da ação dos linfócitos T CD4⁺ (secretores de citocinas) e dos linfócitos T CD8⁺ (efetores citotóxicos) são essenciais, tanto para resposta contra o CBC quanto para o desenvolvimento de mecanismos para a sua regressão (Gaspari; Sauder, 2003).

Acredita-se que a resposta imune mediada por células contribua para os casos descritos de regressão espontânea do CBC. Hunt et al. (1994) descreveram um amplo infiltrado de linfócitos CD3⁺ e CD4⁺ ativados ao redor de CBC em regressão quando comparados com tumores não regredidos. Wong et al. (2000), após análise dos níveis de citocinas presentes em CBC em regressão e não regredidos concluíram que as citocinas tipo Th1 (IL-12, TNF- β e IFN- γ) têm importante papel na regressão dos CBC.

A observação de que CBC tratados com IFN apresentavam um aumento no infiltrado dérmico e peritumoral de células T CD4⁺ e as células tumorais passaram a expressar tanto o ligante CD95 (Fas) como o receptor para CD95 (Fas ligante), indicou que esse poderia ser o caminho para a apoptose tumoral (Buechner et al., 1997).

Algumas evidências sugerem que as células T CD4⁺ têm função central no início e na manutenção da resposta imune contra o câncer. Estas são essenciais para a sustentação da função efetora das células T CD8⁺ por meio da secreção de citocinas, como IL-2. As células T CD4⁺ são capazes de iniciar uma resposta antitumoral, mesmo na ausência de células T CD8⁺ (Ossendorp et al., 1998). O mecanismo pelo qual as células T CD4⁺ erradicam o tumor ainda não

está claro, mas estudos sugerem que as citocinas secretadas por essas células (IFN- γ) tenham ação antitumoral e antiangiogênica (Wang RF, 2001).

Braga e colaboradores (2013) analisaram o infiltrado inflamatório, nos diferentes subtipos de CBC (nodular, n=10; infiltrativo, n= 20; superficial, n=18; adenoide, n=10; folicular, n=3; cístico, n=4 e esclerodermiforme, n=6), por meio da identificação e da quantificação de suas células por análise IHQ (CD3, CD8, CD4, CD20, CD68, Ki-67 e mastócitos- MAST cell e azul de toluidina). Os autores demonstraram que os linfócitos TCD4⁺ correspondiam à população mais numerosa (216,2 $\pm$ 22,23), seguidos por mastócitos (111,0 $\pm$ 7,88), linfócitos TCD8⁺ (57,38 $\pm$ 5,94), linfócitos B (55,9 $\pm$ 6,83) e macrófagos (21,18 $\pm$ 2,58). Segundo os autores, apesar da baixa proliferação celular (47,61 $\pm$ 7,48), as formas mais agressivas apresentaram maior celularidade, com infiltrado rico em mastócitos. O subtipo adenoide apresentou o mais denso infiltrado, enquanto o cístico, o mais discreto. Além disso, foi observado uma relação inversa entre o número de mastócitos e de linfócitos T, mas sem correlação com a agressividade. Por fim, os autores sugeriram que o infiltrado inflamatório PN no CBC tem uma resposta imunológica mediada por células TCD4⁺, cuja composição varia de acordo com o tipo de tumor.

Rohrbach et al. (2001) também notaram uma maior distribuição das células imunes ao redor das ilhas de CBC, apenas poucas células invadiram a porção intratumoral. A relação CD4:CD8 foi maior que um em 82% dos CBC oculares e em 88% dos CBC não oculares, não havendo diferença entre eles. Os autores corroboram que as células CD4⁺ sejam as responsáveis pela imunovigilância tumoral.

Nossa análise demonstrou que tumores nodulares apresentavam um infiltrado inflamatório mais evidente concentrando-se ao redor dos blocos tumorais. Já nos tumores superficiais, notou-se um infiltrado inflamatório mais difuso por toda a derme, tornando-se um pouco mais intenso nas áreas de proximidade do tumor. Em ambos os casos, foi possível encontrar grandes quantidades de linfócitos, macrófagos, mastócitos, e alguns poucos eosinófilos compondo esse infiltrado inflamatório PN.

Concordante com a literatura, em nosso estudo houve encontro de um intenso acúmulo de linfócitos CD3⁺ e CD4⁺ no infiltrado inflamatório PN. Além da periferia, a expressão de CD3⁺ e CD4⁺ também foi detectada em intensidade

leve nas células neoplásicas. Adicionalmente, foram evidenciadas elevadas porcentagens de imunomarcagem de CD25⁺ nos sítios PN, sugerindo ação proeminente desta subpopulação de linfócitos no microambiente tumoral. As Cneo também apresentaram expressão desse marcador em alguns tumores.

A expressão de CD3⁺ e CD4⁺ no infiltrado PN não foi distinta entre CBCn e CBCs. Por outro lado, na análise da topografia tumoral, foi detectada a presença mais frequente de CD4⁺ em tumores não cefálicos, o que sugere uma menor imunossupressão dessas áreas, e possível correlação com menor fotoexposição.

Kaporis et al. (2007) quantificaram, localizaram e descreveram o fenótipo do infiltrado associado ao CBC, com o estudo de 20 CBCn através de técnicas de IHQ, PCR por transcriptase reversa e microarranjos. Na IHQ, foram analisados a região tumoral (RT), derme justatumoral (DJT), derme papilar não lesada (DPNL) e a epiderme não lesada (ENL), comparando com epiderme (EN) e derme papilar (DPN) normais de área não fotoexposta, provenientes de voluntários saudáveis. Os marcadores utilizados na IHQ de tecido congelado foram CD1b/c, CD11c, CD1a, CD8, CD3, CD83, CD40, CD16, CD25, HLADR, CD86, Langerina, DC-LAMP, CTACK/CCL27 e FOXP3. As células CD3⁺ foram significativamente maiores na DJT quando comparada com a DPN ($p < 0,01$). Encontraram mais agregados celulares compostos por CD8⁺ e CD3⁺ na DJT. Houve maior marcação de FOXP3 na DJT quando comparada com DPNL ($p < 0,01$) e DPN ($P < 0,0001$). Na análise da PCR por transcriptase reversa, observaram um aumento de IL-4, IL-10, IL-CCL22, P19 e IL-23 no CBC quando comparado à pele normal. Por sua vez, o tumor apresentou baixos níveis de IFN- γ , TGF- β , e IL-17 quando comparados aos da pele normal. Dessa forma, os autores sugerem que as células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (conhecidas como células Treg) situam-se ao redor dos CBC e que há um aumento da expressão de IL-4, IL-10 e CCL22, o que favorece um microambiente Th2.

As Treg apresentam como marcadores o CD25, o gene relacionado com a família TNFR induzido por glicocorticoides (GITR), o antígeno 4 do linfócito T citotóxico (CTLA-4) e o FOXP3. O CD25 não é exclusivo das Treg, pois também está presente em linfócitos não reguladores, e o GITR e o CTLA-4 podem ser expressos também por células T efetoras. Portanto, o FOXP3 é o melhor marcador das células Treg CD4⁺ identificadas em humanos (Walker et al., 2003).

O FOXP3 é o principal fator de controle para o desenvolvimento e função imunorreguladora das células Tregs, quando da participação na patogênese de doenças autoimunes e na evasão das células tumorais (Williams; Rudensky, 2007).

A presença de células T $CD4^+CD25^{low}$ aumenta a regressão de tumores, enquanto células T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ inibem a atividade antitumoral específica dos linfócitos T $CD8^+$ (Antony et al., 2005). Esses linfócitos T $CD4^+CD25^{high}FOXP3^+$ são conhecidos como *natural* Treg correspondem de 5 a 6% da população de linfócitos T $CD4^+$. Sua função é suprimir a resposta imune evitando o desenvolvimento de doenças autoimunes, porém sua presença no microambiente tumoral pode justificar a ineficiência do sistema imune em controlar a evolução do tumor (Wang HY; Wang RF, 2007).

Novas evidências tem sustentado que a presença de células Treg no microambiente tumoral inibe a imunidade antitumoral. Antígenos expressos pelas células neoplásicas podem estimular preferencialmente células Th $CD4^+$, células Treg ou ambas. A presença da citocina IL-2 é necessária para a manutenção da célula Treg periférica, mas não para sua diferenciação (D'Cruz et al., 2005). A IL-10 secretada por células tumorais e por APC levam a maturação de célula T $CD4^+naive$ em célula Tr1, assim como promovem a conversão de células T $CD4^+CD25^-$ em células T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$, que facilitam o desenvolvimento tumoral (Wang HY; Wang RF, 2007).

Nossos resultados evidenciaram a expressão de CD25 e FOXP3 no infiltrado de células neoplásicas e PN dos CBC. Chen et al. (2011) analisaram a expressão de FOXP3 em 21 CBC, mas não encontraram diferenças estatísticas entre as áreas fotoexpostas e não fotoexpostas. Todavia, consideraram a possibilidade de que a RUV estaria sendo atenuada pelo pigmento dos CBC pigmentados, e optaram por dividir o grupo em pigmentados e menos pigmentados. Dessa forma, encontraram maiores marcações em homens, mulheres e no total dos casos menos pigmentados ($p=0,039$; $p=0,044$; $p=0,0032$ respectivamente), sugeriram que a presença do FOXP3 estaria relacionado a progressão tumoral em áreas fotoexpostas, porém concluíram que os mecanismos para esse fenômeno necessitariam de mais estudos. Os autores ainda observaram a presença das células FOXP3⁺ apenas no infiltrado inflamatório PN, e a ausência de marcação de células neoplásicas. Além da

localização da marcação no infiltrado PN, em interface com tecidos normais, nossos resultados evidenciaram a presença de FOXP3⁺ nas células neoplásicas (80% dos CBCn e em 87,5% dos CBCs), o que parece indicar alguma ação destas células também no interior do tumor. Deste modo, além da possível ação imunorreguladora que permitiria a evasão e avanço do tumor, as células FOXP3⁺, na função de células Treg, nas células neoplásicas precisam ser elucidadas.

Embora em intensidade leve, o CBCn apresentou imunomarcação de Cneo significativamente maior de FOXP3⁺ comparado ao CBCs ($p=0,037$). No infiltrado PN, não houve diferença estatística significativa da expressão do FOXP3⁺ nos diferentes subtipos ($p=0,97$) e topografias ($p=0,77$).

Por outro lado, os resultados da qPCR demonstraram tendência ao aumento de expressão do FOXP3⁺ nos CBCs quando comparada à do CBCn e da pele normal, porém sem significância ($p=0,06$). Nesta questão, ressaltamos a relevância desta análise sob vários ângulos e métodos, IHQ e qPCR, a despeito da discordância dos resultados. Uma tendência do aumento da expressão FOXP3 poderia estar relacionada à imunossupressão local da resposta antitumoral e maior potencial de crescimento ou invasão destes tumores.

A expressão do HLA-G foi demonstrada na população de células Treg CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, presentes no timo e no sangue periférico (Feger et al., 2007).

Deste modo, buscamos analisar a expressão de HLA-G nos diferentes subtipos do CBC comparada à pele normal. Nossos resultados evidenciaram a ocorrência de expressão do HLA-G nos sítios PN e nas Cneo. No infiltrado PN, a expressão foi detectada em todas as amostras estudadas (100%), sendo ausente na epiderme livre do tumor. A expressão do HLA-G nos sítios PN e nas Cneo na totalidade dos CBC evidencia a participação destas moléculas na imunomodulação e evasão do tumor. O encontro de maior expressão em intensidade moderada de HLA-G nas Cneo de CBCn comparada aos CBCs ($p=0,04$), pode indicar potencial de agressividade e recorrência destes tumores.

Em concordância, Urosevic et al. (2005) observaram a expressão do HLA-G em 90% na análise por IHQ de CBC primários e recorrentes.

Aractingi et al. (2003) evidenciaram a expressão de HLA-G, por meio de IHQ, nos vários tumores malignos epiteliais e lesões cutâneas benignas de

transplantados renais. A proteína foi expressa apenas nas lesões malignas, sendo 14% dos CBC, porém nenhuma das 24 lesões benignas apresentou qualquer marcação, demonstrando que a expressão de HLA-G é restrita a lesões malignas.

Em estudo prévio, Urosevic e Dummer (2003 [b]) avaliaram a expressão da proteína HLA-G em CBC primários, por meio de IHQ, e observaram maior expressão em formas agressivas (CBC esclerodermiforme) comparadas às menos agressivas (CBCn e CBCs).

Em seguida, Urosevic et al. (2005) analisaram a expressão do HLA-G e o impacto na recorrência de uma série de CBC. No total de 38 amostras de CBC primários e 14 recorrentes, sendo 11 CBCs, 16 CBCn e 25 de CBC esclerodermiforme, a expressão de HLA-G foi evidenciada em 47 tumores (90%). Em 9 casos (17%) foi possível observar também marcação nas células mononucleares peritumorais. Entre os tumores primários, os CBCn apresentaram predominância na expressão do HLA-G; enquanto entre os recorrentes, os CBC esclerodermiformes superavam os demais na expressão da molécula. Dessa forma, sugeriram que o HLA-G possa estar associado ao fenótipo agressivo, em semelhança aos outros tipos de câncer.

A expressão de moléculas HLA-G presente em neoplasias, (Bukur; Seliger, 2003; Paul et al., 1998) não permitiria o reconhecimento das células neoplásicas pelas células NK (Chang et al., 2003; Marincola et al., 2003). Embora em porcentagens variáveis, a expressão do HLA-G é mais evidente em tumores de maior malignidade ou mais invasivos, e pouco detectada naqueles de comportamento mais benigno (Davidson et al., 2005; Singer et al., 2003). Em melanomas, a elevada expressão das moléculas HLA-G (Ibrahim et al., 2004; Chang et al., 2003; Adrian Cabestre et al., 1999; Paul et al., 1998) estaria relacionada ao efeito inibitório da lise das células NK e ao favorecimento da evasão das células tumorais (Algarra et al., 2004).

De acordo com Jang (2008) e Clark et al. (2008), o recrutamento de células Treg FOXP3⁺ também prejudica a resposta imune antitumoral no CEC.

Lee et al. (2011) observaram aumento da expressão de IL-1b, IL-6, TGF- β no CEC oral e concluíram que a prevalência de linfócitos CD4⁺FOXP3⁺ produtores de IL-17 é aumentada no CEC oral.

Recentemente, uma subpopulação de célula *helper* foi descrita e designada Th17, por produzirem IL-17. Esses linfócitos se desenvolvem por meio de distintos sinais de citocinas e de produtos indutores das linhagens Th1 e Th2. As células Th1 são responsáveis, principalmente, pelo *clearance* de patógenos intracelulares através da ação do IFN- γ e da IL-12. As células Th2 respondem a parasitas, com a produção de IL-4 e IL-10. Já as células Th17 seriam estimuladas pelas citocinas TGF- β e IL-6 (Harrington et al., 2005). Os linfócitos Th17 são responsáveis pela proteção contra alguns patógenos distintos daqueles de perfil Th1 e Th2, além de responderem pelo recrutamento da imunidade inata e promoverem destruição de tecidos autoimunes (Wilson et al., 2007).

Figura 16 - Diferenciação da linhagem efetora das células T CD4⁺

As citocinas indicadas nas flechas são aquelas necessárias para diferenciação de cada subpopulação de células efetoras. As citocinas descritas abaixo dos linfócitos são as principais produzidas por uma destas subpopulações. (Adaptado de Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Review. Immunity. 2000;24:p678).

Langowski e colaboradores (2006) descrevem o papel da IL-23 nos eventos que levam ao desenvolvimento de tumores, a citocina atuaria aumentando a ação das metaloproteinases 9 e estimulando a angiogênese, enquanto reduziria a infiltração por linfócitos TCD8⁺. Acredita-se que IL-6, IL-17 e

IL-23 presentes em ambientes inflamatórios contribuam para o desenvolvimento da carcinogênese. Já se conhece a importância do microambiente inflamatório no início e progressão das malignidades (Muranski; Restifo, 2009), porém ainda não está claro o papel de algumas citocinas na sua evolução. Numasaki et al. (2003) sugerem que a IL-17 parece ser responsável pela neovascularização tumoral e pela supressão de células efectoras, propiciando o crescimento tumoral. Por outro lado, Kaiga et al. (2007) demonstraram que a administração sistêmica de altas doses de IL-23 em camundongos levou a redução de tumores e aumento da sobrevida por mecanismos que aumentaram a resposta das células T citotóxicas sem implicarem em aumento da produção de IFN- γ . Yang et al. (2008) relataram que as células Treg (linfócitos T FOXP3⁺) podem se tornar Th17 e vice versa.

Elamin et al. (2008) compararam os níveis de citocinas em amostras de CBC (n=18) de diferentes localizações e subtipos com tumores de células escamosas (doença de Bowen e ceratoses actínicas, n=9). Por meio de técnicas de imunoensaio foram avaliadas as citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α . Os autores descreveram maiores concentrações de IL-1 β , IL-4, IL-5 e IL-6 nos CBC comparados com os tumores escamosos. Níveis significativamente maiores de TNF- α (p=0,042), IL-4 (p=0,028) e IL-5 (p=0,012) em tumores localizados em região de cabeça e de pescoço quando comparados com tumores de tronco e de extremidades. As concentrações de IL-6 foram maiores nas variantes agressivas de CBC (micronodular e infiltrativo), mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,068). Os autores concluíram que os achados confirmam que o CBC é um tumor cujo microambiente tumoral predomina citocinas do tipo Th2, sendo que tumores de cabeça e de pescoço apresentam uma maior evidência desse predomínio.

Nossos achados do aumento da citocinas IL-6 e IL-17 nos subtipos de CBC em relação a pele normal, são indicativos da ação das células Treg e da predominância do perfil Th17 no microambiente tumoral, ou seja, facilitador da neovascularização tumoral e supressão de células efectoras, propiciando o crescimento tumoral (Numasaki et al., 2003). Em contraste com a literatura, nossos resultados não identificaram o perfil predominantemente Th2 no ambiente microtumoral. A expressão do IL-4 foi menor em tumores comparada à da pele normal; e o amplo desvio padrão da expressão de IL-10, prejudicou a análise da

comparação entre tumores e a pele normal, que poderia ser minimizado com o aumento do tamanho amostral.

A IL-17 estimula a secreção de IL-6, IL-8, e prostaglandinas por células endoteliais e epiteliais, e pode favorecer a neovascularização associada ao tumor, potencializando o seu crescimento (Muranski; Restifo, 2009). A inflamação causada pela IL-17 e IL-23 parece contribuir para a carcinogênese (Langowski et al., 2006).

Os níveis de expressão de IL-23 foram similares nos CBCn e inferiores nos CBCs, em comparação ao da pele normal. Enquanto, os níveis de expressão de IFN- γ foram discretamente elevados nos CBCn, e os CBCs mostraram expressão semelhante à da pele normal.

Ainda, em concordância com estudos prévios (Aoki et al, 2003; Gambichler et al, 2006), houve maior expressão de IL-8 nos tumores comparada à da pele normal, e adicionalmente nos tumores não-cefálicos quando comparados aos cefálicos ($p=0,002$). No entanto, a expressão das citocinas IL-6, IL-4, IL-17 e IL-8 foram similares nos subtipos tumorais, CBCn e CBCs.

Gambichler et al. (2006) investigaram a expressão de mRNA de TNF- α , IL-6, e IL-8 em fragmentos de CBC ($n=22$), e de pele normal de pacientes ($n=22$) e de indivíduos saudáveis ($n=25$). A expressão de citocinas foi semelhante na pele normal de indivíduos saudáveis e de pacientes ($p>0,05$). Porém, os níveis de IL-6 e IL-8 foram mais elevados nos CBC comparados aos demais grupos ($p<0,05$), mas sem diferenças estatísticas para a expressão de TNF- α ($p>0,05$). A expressão das citocinas nos CBCn e nos CBCs mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p>0,05$). Concordantes com esses autores, evidenciamos maior expressão de IL-6 e de IL-8 nos tumores em relação a pele normal. Adicionalmente, houve o aumento da expressão da IL-8 em tumores não-cefálicos e uma tendência do aumento da IL-6 nos tumores não-cefálicos ($p=0,08$).

Aoki et al. (2003) desenharam um estudo para elucidar a provável relação entre os mastócitos e o CBC, avaliando a relação dessas células com o infiltrado inflamatório e com a neoangiogênese. Os autores estudaram apenas CBC nodulares ($n=16$) através de IHQ e PCR, comparando-os à pele normal. Em concordância com estudos prévios, descrevem as células TCD4⁺ como população predominante no infiltrado PN, e o encontro de quantidades significativamente

maiores de mastócitos, VEGF⁺ e IL8 ($p < 0,0001$) nos tumores comparadas à pele normal. A marcação de células VEGF⁺ se correlacionou com a contagem de microvasos. Foi evidenciada a expressão de IL-8 apenas nos tumores e não na pele normal, corroborando nossos resultados, que adicionalmente mostrou a expressão aumentada nos tumores não-cefálicos.

A ação de IL-8 é estimular a migração de neutrófilos e aumentar a expressão de moléculas de adesão por células endoteliais (Baggiolini et al., 1994). Elevadas concentrações de IL-8 e VEGF foram evidenciadas no estroma de CBC (Aoki et al., 2003). Ainda, a correlação do aumento da expressão de IL-6 com IL-8 em CBC associam essas citocinas ao microambiente favorável ao desenvolvimento do tumor (Gambichler et al., 2006), contrariando esses resultados nossos achados não demonstraram correlação entre a expressão de IL-6 e IL-8 para os tumores CBCs e CBCn ($r = 0,09$; $p = 0,81$ e $r = 0,16$; $p = 0,55$ respectivamente) e nem para a topografia cefálico e não-cefálico ($r = -0,04$; $p = 0,90$ e $r = 0,62$; $p = 0,06$, respectivamente).

O estudo de O'Grady et al. (2004) demonstrou uma maior densidade microvascular nas margens de CBC invasivos em relação aos CEC em indivíduos transplantados renais. Staibano et al. (1996) já haviam demonstrado que os CBC agressivos apresentavam maior contagem de microvasos em relação aos tumores não agressivos.

Oh et al. (2003) compararam CBC não agressivos ($n = 4$, variantes nodular e superficial) e CBC agressivos ($n = 4$, variantes infiltrativo, esclerodermiforme, basoescamoso e recorrente). Através de técnicas de PCR por transcriptase reversa e quantificação da densidade microvascular, foi analisada a expressão de fatores pró-angiogênicos e inibidor da angiogênese, ou seja, fator de crescimento fibroblástico (bFGF) e VEGF versus trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente. Os níveis de bFGF e TPS-1 não mostraram diferenças estatísticas significantes entre os tumores agressivos e não agressivos. Já o VEGF foi 3,5 vezes maior em CBC agressivos. Além de indicar que a angiogênese depende da presença do VEGF, e que a sua expressão mantém relação com a maior densidade microvascular, estes achados sugerem que esse marcador possa ser, por meio da angiogênese, um relevante caminho de progressão dos CBC agressivos.

Em concordância, a imunomarcação com o VEGF foi infrequente no interior dos tumores (23,1%), ainda que em intensidade leve e moderada; e mais evidente e concentrada na área PN (96,1%), com marcação em mastócitos, linfócitos e células endoteliais de neovasos, representando frequências médias de 36,7% e 48,3%, respectivamente. A imunomarcação para VEGF mostrou-se concentrada em áreas com maior densidade do infiltrado PN e de neoformação vascular; e menos intensa em áreas de menor densidade de neovascularização e da escassez do infiltrado inflamatório PN. Portanto, evidenciamos que ambos os subtipos e nas diferentes topografias expressam sem distinção VEGF em sua periferia, e no interior dos tumores, predominantemente em CBCn. Considerando-se o conjunto destes achados, pode ser pressuposto que CBC possam ser potencialmente invasivos.

6 CONCLUSÕES

Considerando-se a elevada prevalência do CBC, a elucidação dos mecanismos imunomoduladores envolvidos no desenvolvimento do tumor constitui-se em um campo atraente de investigação e de perspectivas terapêuticas.

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

a. Na amostra do estudo houve marcante predomínio de CBC provenientes de áreas fotoexpostas (84,62%); sem distinção entre os subtipos CBC nodular e CBC superficial, e da sua frequência entre gêneros, mas com discreta tendência do CBC superficial em mulheres;

b. Nos fragmentos de CBCs e CBCn foi evidenciado, por meio da IHQ, intenso acúmulo de linfócitos CD3⁺ e CD4⁺ no infiltrado inflamatório PN, ressaltando o papel destas subpopulações na resposta imune destes tumores;

c. A expressão de CD4 mais frequente em tumores não-cefálicos sugere que a resposta inflamatória mais acentuada represente um menor potencial de imunossupressão nessas áreas, e possível relação com a reduzida fotoexposição;

d. O encontro de células marcadas por CD25 nas localizações PN sugere o papel proeminente desta subpopulação de linfócitos na resposta imune no microambiente tumoral;

e. A expressão de células FOXP3⁺ no infiltrado PN dos CBC é indicativa de imunossupressão, que potencialmente permitiria a progressão da neoplasia;

f. A ocorrência de expressão do HLA-G nas células neoplásicas, mas em particular no sítio PN em todas as amostras estudadas, e a sua ausência na epiderme livre do tumor e pele normal PN corrobora o seu papel para a potencial evasão do CBC;

g. A tendência ao aumento de expressão do FOXP3⁺, por meio de qPCR, nos CBCs quando comparada à do CBCn sugere a possibilidade de imunossupressão no primeiro subtipo o que poderia propiciar o seu padrão de crescimento;

h. O encontro do aumento da expressão das citocinas IL-6 e IL-17 nos dois subtipos de CBC, em relação à pele normal, são indicativos da

predominância do perfil Th17 no microambiente tumoral, possivelmente facilitando a neovascularização tumoral, supressão de células efectoras, e o crescimento tumoral;

i. O aumento da expressão de IL-8 em ambos os subtipos de CBC comparados à da pele normal favorece o desenvolvimento do tumor;

j. Os achados da elevação de IL-17, IL-6 e IL-8 são condizentes com o favorecimento da neovascularização associada ao tumor, evidenciada pela elevada expressão de VEGF no sítio PN;

k. A expressão de VEGF concentrada em áreas com maior densidade do infiltrado PN e de neoformação vascular indica o potencial invasivo de elevado percentual dos CBC;

l. A ausência de diferenças significantes da expressão de CD3, CD4, CD25, FOXP3, HLA-G e VEGF no infiltrado PN e das citocinas IL-6, IL-4, IL-17 e IL-8, por meio dos métodos de IHQ e qPCR, respectivamente, indica que os subtipos nodular e superficial de CBC possam ter similaridade da resposta imune tumoral.

Em suma, o microambiente tumoral do CBC foi caracterizado por resposta imunológica mediada por células T CD4⁺ e participação de potencial ação imunomoduladora de linfócitos CD25⁺, FOXP3⁺ e do HLA-G. Há predomínio do perfil Th17, e a presença das citocinas IL-17, IL-6 e IL-8 favorecem a neovascularização e podem influenciar o microambiente do CBC para evasão tumoral.

REFERÊNCIAS

Adrian Cabestre F, Moreau P, Riteau B, Ibrahim EC, Le Danff C, Dausset J, et al. HLA- G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J Reprod Immunol*. 1999;43:183-93.

Akbar AN, Taams LS, Salmon M, Vukmanovic-Stejić M. The peripheral generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. Review. *Immunology*. 2003;109:319-25.

Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother*. 2004;53:904-10.

Amerio P, Toto P, Feliciani C, Suzuki H, Shivji G, Wang B, et al. Rethinking the role of tumour necrosis factor- α in ultraviolet (UV) B-induced immunosuppression: altered immune response in UV-irradiated TNFR1R2 gene-targeted mutant mice. *Br J Dermatol*. 2001;144:952-7.

Andrade P, Brites MM, Vieira R, Mariano A, Reis JP, Tellechea O, et al. Epidemiology of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas in a Department of Dermatology - a 5-year review. *An Bras Dermatol*. 2012;87:212-9.

Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol*. 2005;174:2591-601.

Aoki M, Pawankar R, Niimi Y, Kawana S. Mast cells in basal cell carcinoma express VEGF, IL-8 and RANTES. *Int Arch. Allergy Immunol*. 2003; 130:216-23.

Aractingi S, Kanitakis J, Euvrard S, Le Danff C, Carosella ED. Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. *Int J Cancer*. 2003;106:232-5.

Archontaki M, Stavrianos SD, Korkolis DP, Arnogiannaki N, Vassiliadis V, Liapakis IE, et al. Giant Basal cell carcinoma: clinicopathological analysis of 51 cases and review of the literature. Review. *Anticancer Res*. 2009;29:2655-63.

Armstrong BK, Kricke A. Skin cancer. Review. *Dermatol Clin*. 1995;13:583–94.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin 8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* 1994;55:97-179.

Bahner JD, Bordeaux JS. Non-melanoma skin cancers: photodynamic therapy, cryotherapy, 5-fluorouracil, imiquimod, diclofenac, or what? Facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2013;31:792-8.

Bastiaens MT, Hoefnagel JJ, Bruijn JA, Westendorp RG, Vermeer BJ, Bouwes Bavinck JN. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. *J Invest Dermatol.* 1998 Jun;110:880-4.

Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, Williams HC. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. Review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(1):CD003412.

Bergstresser PR. Ultraviolet immunosuppression. *Dermatol Found.* 2000;34:1–12.

Berzofsky JA, Terabe M. A novel immunoregulatory axis of NKT cell subsets regulating tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57:1679-83.

Betti R, Radaelli G, Mussino F, Menni S, Crosti C. Anatomic location and histopathologic subtype of basal cell carcinomas in adults younger than 40 or 90 and older: any difference? *Dermatol Surg.* 2009;35:201-6.

Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol.* 2002;29:585-9.

Bower CP, Lear JT, Bygrave S, Etherington D, Harvey I, Archer CB. Basal cell carcinoma and risk of subsequent malignancies: A cancer registry-based study in southwest England. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42:988-91.

Braga JRM, Sadigursky M, Barbosa Junior AA. O mosaico inflamatório nos subtipos de carcinoma basocelular. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2013; 59:531-8.

Brasileiro Filho G, Reis LFL, Barbosa AJA, Miranda D. Métodos de estudo em Patologia. In: Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia*. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.6-20.

Buechner SA, Wernli M, Harr T, Hahn S, Itin P, Erb P. Regression of basal cell carcinoma by intralesional interferon-alpha treatment is mediated by CD95 (Apo-1/Fas)-CD95 ligand-induced suicide. *J Clin Invest* 1997;100:2691–6.

Buh Gasparic M, Tengs T, La Paz JL, Holst-Jensen A, Pla M, Esteve T, et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 396:2023-9.

Bukur J, Seliger B. The role of HLA-G for protection of human renal cell-carcinoma cells from immune-mediated lysis: implications for immunotherapies. *Semin Cancer Biol*. 2003;13:353-9.

Buschmann W. A reappraisal of cryosurgery for eyelid basal cell carcinomas. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:453-7.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:169–93.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611-22.

Carucci JA, Leffell DJ. Basal cell carcinoma. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed. New York: McGraw-Hill; 2008. p.1036–42.

Ceilley RI, Del Rosso JQ. Current modalities and new advances in the treatment of basal cell carcinoma. Review. *Int J Dermatol*. 2006;45:489-98.

Chang CC, Murphy SP, Ferrone S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. *Hum Immunol*. 2003;64:1057-63.

Chang S, Chen W, Yang J. Another formula for calculating the gene change rate in real-time RT-PCR. *Mol Biol Rep*. 2009;36:2165-8.

Chen L, Shen Z, Wu J. Effects of ultraviolet radiation exposure on FOXP3⁺ infiltration in cutaneous squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2011;27:297-303.

Chiller K, Passaro D, McCalmont T, Vin-Christian K. Efficacy of curettage before excision in clearing surgical margins of nonmelanoma skin cancer. *Arch Dermatol.* 2000;136:1327-32.

Chinem VP, Miot HA. Epidemiologia do carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol.* 2011;86:292-305.

Cirrone F, Harris CS. Vismodegib and the hedgehog pathway: a new treatment for basal cell carcinoma. Review. *Clin Ther.* 2012;34:2039-50.

Clark RA, Huang SJ, Murphy GF, Mollet IG, Hijnen D, Muthukuru M, et al. Human squamous cell carcinomas evade the immune response by down-regulation of vascular E-selectin and recruitment of regulatory T cells. *J Exp Med.* 2008;205:2221-34.

Corona R. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: a review. *Ann Ist Super Sanita.* 1996;32:37-42.

Corrêa Mde P, Ferreira AP, Gollner AM, Rodrigues MF, Guerra MC. A expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol.* 2009;84:606-14.

Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. Review. *Mod Pathol.* 2006;19:127-47.

Custódio G, Locks LH, Coan MF, Gonçalves CO, Trevisol DJ, Schuelter-Trevisol F. Epidemiologia dos carcinomas basocelulares em Tubarão, Santa Catarina (SC), Brasil, entre 1999 e 2008. *An Bras Dermatol.* 2010;85:815-26.

Davidson B, Elstrand MB, McMaster MT, Berner A, Kurman RJ, Risberg B, et al. HLA-G expression in effusions is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2005;96:42-7.

D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol.* 2005;6:1152-9.

de Faria J. Basal cell carcinoma of the skin with areas of squamous cell carcinoma: a basosquamous cell carcinoma? *J Clin Pathol.* 1985;38:1273-7.

de Laat JM, de Gruijl FR. The role of UVA in the aetiology of non-melanoma skin cancer. Review. *Cancer Surv.* 1996;26:173-91.

de Silva SP, Dellon AL. Recurrence rate of positive margin basal cell carcinoma: results of a five-year prospective study. *J Surg Oncol.* 1985;28:72-4.

Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, Kirkpatrick N et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* 2008;68: 3001–9.

Edens BL, Bartlow GA, Haghighi P, Astarita RW, Davidson TM. Effectiveness of curettage and electrodesiccation in the removal of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 1983;9:383-8.

Elamin I, Zecević RD, Vojvodić D, Medenica L, Pavlović MD. Cytokine concentrations in basal cell carcinomas of different histological types and localization. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2008;17:55-9.

Epstein E. Fluorouracil paste treatment of thin basal cell carcinomas. *Arch Dermatol.* 1985;12:207-13.

Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Dureau G, Touraine JL, Faure M, et al. Comparative epidemiologic study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol.* 1995;33:222-9.

Fallen RS, Gooderham M. Ingenol mebutate: an introduction. *Skin Therapy Lett.* 2012;17:1-3.

Feger U, Tolosa E, Huang YH, Waschbisch A, Biedermann T, Melms A, et al. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood.* 2007;110:568-77.

Ferrara N, Keyt B. Vascular endothelial growth factor: basic biology and clinical implications. Review. *EXS.* 1997;79:209-32.

Filipowicz E, Adegboyega P, Sanchez RL, Gatalica Z. Expression of CD95 (Fas) in sun-exposed human skin and cutaneous carcinomas. *Cancer.* 2002; 94:814-9.

Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*. 1971;133:275-88.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FOXP3. *Immunity* 2005;22: 329–41.

Gailani MR, Leffell DJ, Ziegler AM, et al. Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:349–54(a).

Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, et al. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet*. 1996;14:78-81(b).

Gailani MR, Bale AE. Developmental genes and cancer: role of patched in basal cell carcinoma of the skin. Review. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89:1103-9.

Gallagher RP, Ma B, McLean DI, Yang CP, Ho V, Carruthers JA, et al. Trends in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma of the skin from 1973 through 1987. *J Am Acad Dermatol*. 1990;23:413-21.

Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA et al. FOXP3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007;445:771-5.

Gambichler T, Skrygan M, Hyun J, Bechara F, Tomi NS, Altmeyer P, Kreuter A. Cytokine mRNA expression in basal cell carcinoma. *Arch Dermatol Res*. 2006; 298:139-41.

Garcia C, Poletti E, Crowson AN. Basosquamous carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2009;60:137-43.

Garcia JA, Cohen PR, Herzberg AJ, Wallis ME, Rapini RP. Pleomorphic basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32:740-6.

Gaspari AA, Sauder DN. Immunotherapy of basal cell carcinoma: evolving approaches. Review. *Dermatol Surg*. 2003;29:1027-34.

Gause WC, Adamovicz J. The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Meth Appl*. 1994;3:123-35.

Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies. *J Am Acad Dermatol*. 2004; 50:722-33.

Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. 2001;294:605-9.

Goldberg LH. Basal cell carcinoma. *Lancet*. 1996;347:663-7.

Gomes AQ, Correia DV, Silva-Santos B. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. Review. *EMBO Rep*. 2007;8:1024-30.

Gormley DE, Hirsch P. Aggressive basal cell carcinoma of the scalp. *Arch Dermatol*. 1978;114:782-3.

Greinert R. Skin cancer: new markers for better prevention. Review. *Pathobiology*. 2009;76:64-81.

Grosshans E, Misago N, Sánchez Yus E, Soyer HP, Requena L. A basaloid neoplasm with ductal differentiation. *Am J Dermatopathol*. 2003;25:77-80.

Gunnarson G, Larkö O, Hersle K. Cryosurgery of eyelid basal cell carcinomas. *Acta Ophthalmol*. 1990;68:241-5.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996;85:841-51.

Halliday GM, Patel A, Hunt MJ, Tefany FJ, Barnetson RS. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4⁺ T cells. *World J Surg*. 1995;19:352–8.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6:1123-32.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6:986-94.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265:621-36.

Hendrix JD Jr, Parlette HL. Micronodular basal cell carcinoma. A deceptive histologic subtype with frequent clinically undetected tumor extension. *Arch Dermatol*. 1996;132:295-8.

Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grussel S, Sipos B et al. FOXP3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* 2007;67: 8344–50.

Hofman FM, Taylor CR. Immunohistochemistry. *Curr Protoc Immunol*. 2013;103:21.4.1-21.4.26.

Howell BG, Solish N, Lu C, Watanabe H, Mamelak AJ, Freed I, et al. Microarray profiles of human basal cell carcinoma: insights into tumor growth and behavior. *J Dermatol Sci*. 2005;39:39–51.

Hunt MJ, Halliday GM, Weedon D, Cooke BE, Barnetson RS. Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol*. 1994;130:1–8.

Ibrahim EC, Aractingi S, Allory Y, Borrini F, Dupuy A, Duvillard P, et al. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer*. 2004;108:243-50.

Instituto Nacional de Câncer - INCA [internet]. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. [Acesso: 20 Jul. 2008]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>.

Instituto Nacional de Câncer - INCA [internet]. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. [Acesso: 08 Fev. 2014]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2013/apresentacao-estimativa-2014.pdf>.

Jacob A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. *Dublin Hospital Rep Commun Med Surg*. 1827;4:232–9.

Jang TJ. Prevalence of FOXP3 positive T regulatory cells is increased during progression of cutaneous squamous tumors. *Yonsei Med J*. 2008;49:942–8.

Jee SH, Chu CY, Chiu HC, Huang YL, Tsai WL, Liao YH, et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *J Invest Dermatol*. 2004;123:1169-75.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *Cancer J Clin*. 2008; 58:71-96.

Jurciukonyte R, Vincerzevskiene I, Krilaviciute A, Bylaite M and Smailyte G. Epidemiology of basal cell carcinoma in Lithuania, 1996-2010. *British Journal of Dermatology*. 2013;169:1100-5.

K D, M M, N Abdu N. Pigmented Basal cell carcinoma: a clinical variant, report of two cases. *J Clin Diagn Res*. 2013;7:3010-1.

Kaiga T, Sato M, Kaneda H, Iwakura Y, Takayama T, Tahara H. Systemic administration of IL-23 induces potent antitumor immunity primarily mediated through Th1-type response in association with the endogenously expressed IL-12. *J Immunol*. 2007;178:7571-80.

Kaporis HG, Guttman-Yassky E, Lowes MA, Haider AS, Fuentes-Duculan J, Darabi K, et al. Human basal cell carcinoma is associated with FOXP3⁺ T cells in a Th2 dominant microenvironment. *J Invest Dermatol*. 2007;127:2391-8.

Karagas MR, Greenberg ER, Spencer SK, Stukel TA, Mott LA. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int J Cancer*. 1999;81:555-9.

Karagas MR, Stannard VA, Mott LA, Slattery MJ, Spencer SK, Weinstock MA. Use of tanning devices and risk of basal cell and squamous cell skin cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94:224-6.

Kunte C, Konz B. Current recommendations in the treatment of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. Review. *Hautarzt*. 2007;58:419-26.

Kwan W, Wilson D, Moravan V. Radiotherapy for locally advanced basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60:406-11.

Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006;442:461-5.

Larcher F, Robles AI, Duran H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res*. 1996;56:5391-6.

Lawrence CM. Mohs' micrographic surgery for basal cell carcinoma. Review. *Clin Exp Dermatol*. 1999;24:130-3.

Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1999;11:1351-6.

Lear W, Dahlke E, Murray CA. Basal cell carcinoma: review of epidemiology, pathogenesis, and associated risk factors. *J Cutan Med Surg*. 2007;11:19-30.

Lee JJ, Chang YL, Lai WL, Ko JY, Kuo MY, Chiang CP, et al. Increased prevalence of interleukin-17-producing CD4⁺ tumor infiltrating lymphocytes in human oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011; 33:1301-8.

Lee MJ, Kim YC, Lew W. A case of superficial epithelioma with sebaceous differentiation. *Yonsei Med J*. 2003;44:347-50.

Leibovitch I, McNab A, Sullivan T, Davis G, Selva D. Orbital invasion by periocular basal cell carcinoma. *Ophthalmology*. 2005;112:717-23.

Liväk KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻[Delta Delta C(T)] Method. *Methods*. 2001; 25:402-8.

Loggini B, Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, De Jeso K, et al. CD34 microvessel density and VEGF expression in basal and squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2003;199:705-12.

Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004;10:190-212.

Mantese SAO, Berbert ALCV, Gomides MDA, Rocha A. Basal cell Carcinoma - Analysis of 300 cases observed in Uberlândia - MG, Brazil. *An. Bras. Dermatol.* 2006;81:136-42.

Marincola FM, Wang E, Herlyn M, Seliger B, Ferrone S. Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. *Trends Immunol.* 2003;24:335-42.

Marmur ES, Schmults CD, Goldberg DJ. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. Review. *Dermatol Surg.* 2004;30:264-71.

Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L, Ghiringhelli F. Human FOXP3 and cancer. Review. *Oncogene*. 2010;29:4121-9.

Martin RC, Edwards MJ, Cawte TG, Sewell CL, McMasters KM. Basosquamous carcinoma: analysis of prognostic factors influencing recurrence. *Cancer* 2000;88:1365-9.

McCormack CJ, Kelly JW, Dorevitch AP. Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma. A possible indicator of differing causes. *Arch Dermatol.* 1997;133:593-6.

Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, Tagliabue E, Balsari A. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:1746-52.

Miki Y. Basal cell epithelioma among Japanese. *Australas J Dermatol.* 1968;9:304-13.

Miller DL, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol.* 1994;30:774–8.

Miller DR, Geller AC, Wyatt SW, Halpern A, Howell JB, Cockerell C, et al. Melanoma awareness and self-examination practices: results of a United States survey. *J Am Acad Dermatol*. 1996;34:962-70.

Misago N, Satoh T, Narisawa Y. Basal cell carcinoma with ductal and glandular differentiation: a clinicopathological and immunohistochemical study of 10 cases. *Eur J Dermatol*. 2004;14:383-7.

Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G, Ullrich SE: Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nat Immunol*. 2000;1:521-5.

Morton CA. Methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy – practical pearls. Review. *J Dermatolog Treat*. 2003;14:23-6.

Muranski P, Restifo NP. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4⁺ T cells. Review. *Curr Opin Immunol*. 2009;21:200-8.

Nagase T, Nagase M, Machida M, Fujita T. Hedgehog signalling in vascular development. Review. *Angiogenesis*. 2008;11:71-7.

Niazi ZB, Lamberty BG. Perineural infiltration in basal cell carcinomas. *Br J Plast Surg*. 1993;46:156-7.

Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med*. 1999;190:617-27.

Nordin P, Stenquist B. Five-year results of curettage-cryosurgery for 100 consecutive auricular non-melanoma skin cancers. *J Laryngol Otol*. 2002;116:893-8.

Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003;101:2620-2627.

O'Driscoll L, McMorrow J, Doolan P, Mc- Kiernan E, Mehta JP, Ryan E, et al. Investigation of the molecular profile of basal cell carcinoma using whole genome microarrays. *Mol Cancer*. 2006;5:74.

O'Grady A, O'Kelly P, Murphy GM, Leader M, Kay E. COX-2 expression correlates with microvessel density in non-melanoma skin cancer from renal transplant recipients and immunocompetent individuals. *Hum Pathol.* 2004; 35:1549-55.

Oh CK, Kwon YW, Kim YS, Jang HS, Kwon KS. Expression of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1 related to microvessel density in nonaggressive and aggressive basal cell carcinomas. *J Dermatol.* 2003;30:306-13.

Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH Jr, Scott MP: Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science.* 1997; 276:817-21.

Ossendorp F, Mengedé E, Camps M, Filius R, Melief CJ. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med.* 1998;187:693-702.

Ossendorp F, Toes RE, Offringa R, Van der Burg SH, Melief CJ. Importance of CD4⁺ T helper cell responses in tumor immunity. *Immunol Lett* 2000;74:75-9.

Pan Z, Huynh N, Sarma DP. Fibroepithelioma of pinkus in a 9-year-old boy: a case report. *Cases J.* 2008;1:21.

Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;14;95:4510-5.

Peres LP, Fiorentin JZ, Baptista TS, Fuzina DG, Blanco LFO. Perfil clínico e histopatológico do carcinoma basocelular em amostra populacional de Criciúma – SC, Brasil. *An Bras Dermatol.* 2012; 87:657-9.

Presser SE, Taylor JR. Clinical diagnostic accuracy of basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1987;16 (5 Pt 1):988-90.

Price MA, Goldberg LH, Levy ML. Juvenile basal cell carcinoma. *Ped Dermatol.* 1994;11:176-7.

Raasch BA, Buettner PG, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br. J. Dermatol.* 2006;155(2):401-7.

Ratner D, Peacocke M, Zhang H, Ping XL, Tsou HC. UV-specific p53 and PTCH mutations in sporadic basal cell carcinoma of sun-exposed skin. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:293-7.

Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H. HLA-G expression in malignant melanoma. Review. *Semin Cancer Biol*. 2007;17:422-9.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. Review. *Nature*. 1997;386:671-4.

Robinson JK, Fisher SG. Recurrent basal cell carcinoma after incomplete resection. *Arch Dermatol*. 2000;136:1318-24.

Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. Review. *Br J Dermatol*. 2007;157:47-51.

Rodgers JR, Cook RG. MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity Review. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:459-71.

Rohrbach JM, Stiemer R, Mayer A, Riedinger C, Duijvestijn A, Zierhut M. Immunology and growth characteristics of ocular basal cell carcinoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:35-40.

Roitt, Brostoff, Male. *Imunologia*. 5ª ed. São Paulo: Manole. 1999; p.123-4

Romero P, Pannetier C, Herman J, Jongeneel CV, Cerottini JC, Coulie PG. Multiple specificities in the repertoire of a melanoma patient's cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MAGE-1.A1. *J Exp Med* 1995;182:1019-28.

Rompel R, Petres J, Kaupert K, Müller-Eckhardt G. Human leukocyte antigens and multiple basal cell carcinomas. *Recent Results Cancer Res*. 1995;139:297-302.

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006, 212:28-50.

Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res*. 2005;65:10139-44.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000;101: 455–8.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. Review. *Immunol Rev*. 2001;182:18-32.

Saldanha G, Fletcher A, Slater DN. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. Review. *Br J Dermatol*. 2003;148:195-202.

Sanderson KV. The architecture of basal-cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 1961;73:455-74.

Sato TA, Winmer MB, Finkelman FD, Madani H, Jacobs CA, Grabstein KH, et al. Recombinant soluble murine IL4 receptor can inhibit or enhance IgE responses in vivo. *J Immunol*. 1993;150:2717-23.

Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001;276: 37672–9.

Schwab R, Weksler ME, Russo C. CD3 pathway of T-cell activation. II. Role of HLA-class I molecules in early events. *Cell Immunol*. 1988;115:310-24.

Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol*. 2002;147:41-7.

Setlow RB, Carrier WL. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J Mol Biol*. 1966;17:237-54.

Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J Am Acad Dermatol*. 1990;23:1118-26.

Shao L, Jacobs AR, Johnson VV, Mayer L. Activation of CD8⁺ regulatory T cells by human placental trophoblasts. *J Immunol*. 2005;174:7539-47.

Sheridan AT, Dawber RP. Curettage, electrosurgery and skin cancer. Review. *Australas J Dermatol*. 2000;41:19-30.

Silverberg MJ, Leyden W, Warton EM, Quesenberry CP Jr, Engels EA, Asgari MM. HIV infection status, immunodeficiency, and the incidence of non-melanoma skin cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105:350-60.

Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res*. 2003;9:4460-4.

Situm M, Buljan M, Bulat V, Lugović Mihić L, Bolanca Z, Simić D. Review. *Coll Antropol*. 2008; 32:167-70.

Skelton LA. The effective treatment of basal cell carcinoma. Review. *Br J Nurs*. 2009;18:348-50.

Smith SP, Grande DJ. Basal cell carcinoma recurring after radiotherapy: a unique, difficult treatment subclass of recurrent basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol*. 1991;17:26-30.

Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol*. 2006;176:1582-7.

Sociedade Brasileira de Dermatologia. Perfil nosológico das consultas dermatológicas no Brasil. *An Bras Dermatol*. 2006;81:549-58.

Soler AM, Warloe T, Berner A, Giercksky KE. A follow-up study of recurrence and cosmesis in completely responding superficial and nodular basal cell carcinomas treated with methyl 5-aminolaevulinate-based photodynamic therapy alone and with prior curettage. *Br J Dermatol*. 2001;145:467-71.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 98:503-17.

Souza CFD, Thomé EP, Menegotto PF, Schmitt JV, Shibue JRT, Tarlé RG. Topografia do carcinoma basocelular e suas correlações com o gênero, a idade e o padrão histológico: um estudo retrospectivo de 1.042 lesões. *An Bras Dermatol*. 2011;86:272-7.

Staibano S, Boscaino A, Slavatore G, Orabone P, Palombini L, Rosa GD: The prognostic significance of tumor angiogenesis in nonaggressive and aggressive basal cell carcinoma of the human skin. *Hum Pathol.* 1996;27:695–700.

Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust.* 2006;184:6-1.

Stockfleth E, Trefzer U, Garcia-Bartels C, Wegner T, Schmook T, Sterry W. The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: an overview. Review. *Br J Dermatol.* 2003;149:53-6.

Su MW, Fromer E, Fung MA. Fibroepithelioma of pinkus. *Dermatol Online J.* 2006;12:2.

Sussman LA, Liggins DF. Incompletely excised basal cell carcinoma: a management dilemma? *Aust N Z J Surg.* 1996;66:276-8.

Takei Y, Fukushima S, Ackerman AB. Criteria for histologic differentiation of desmoplastic trichoepithelioma (sclerosing epithelial hamartoma) from morphea-like basal-cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 1985;7:207-21.

Telfer NR, Colver GB, Morton CA; British Association of Dermatologists. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. Review. *Br J Dermatol.* 2008;159:35-48.

Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mos-mann TR, Moore KW, Rennick DM. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. *J Exp Med.* 1991;173:507-10.

Tuppurainen K. Cryotherapy for eyelid and periorcular basal cell carcinomas: outcome in 166 cases over an 8-year period. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1995;233:205-8.

Urbach F. Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. *J Photochem Photobiol B.* 1997;40:3-7.

Urošević M, Maier T, Benninghoff B, Slade H, Burg G, Dummer R. Mechanisms underlying imiquimod-induced regression of basal cell carcinoma in vivo. *Arch Dermatol.* 2003;139:1325-32.

Urosevic M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer - different stories with the same message. Review. *Semin Cancer Biol.* 2003;13:337-42 (a).

Urosevic M, Dummer R. HLA-G in skin cancer: a wolf in sheep's clothing? Review. *Hum Immunol.* 2003;64:1073-80. (b)

Urosevic M, Kempf W, Zagrodnik B, Panizzon R, Burg G, Dummer R. HLA-G expression in basal cell carcinomas of the skin recurring after radiotherapy. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30:422-5.

Urosevic M, Dummer R. Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. Review. *Cancer Res.* 2008;68:627-30.

Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, Ziegler SF. Induction of FOXP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4⁺CD25⁻ T cells. *J Clin Invest.* 2003;112:1437-43.

Wang HY, Lee DA, Peng G, Guo Z, Li Y, Kiniwa Y, et al. Tumor-specific human CD4⁺ regulatory T cells and their ligands: implication for immunotherapy. *Immunity* 2004;20:107-18.

Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. Review. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19:217–23.

Wang RF. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4⁺ T cells in antitumor immunity. Review. *Trends Immunol.* 2001;22:269-76.

Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Review. *Immunity.* 2000;24:677-88.

Wennberg AM, Larkö O, Stenquist B. Five-year results of Mohs micrographic surgery for aggressive facial basal cell carcinoma in Sweden. *Acta Derm. Venereol.* 1999;79:370-2.

Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007;8:950-7

Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of FOXP3. *Nat Immunol*. 2007;8:277-84.

Wolf DJ, Zitelli JA. Surgical margins for basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 1987;123:340-4.

Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, Cooke B, Barnetson RS, Halliday GM. Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2000;143:91-8.

Wu JK, Oh C, Strutton G, Siller G. An open-label, pilot study examining the efficacy of curettage followed by imiquimod 5% cream for the treatment of primary nodular basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol*. 2006;47:46-8.

Yamamura M, Modlin RL, Ohmen JD, Moy RL. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest*. 1993;91:1005-10.

Yan WH. HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011;11:76-89.

Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008; 29:44-56.

Yoshikawa T, Rae V, Bruins-Slot W, Van den Berg JW, Taylor JR, Streilein JW. Susceptibility to effects of UVB radiation on induction of contact hypersensitivity as a risk factor for skin cancer in humans. *J Invest Dermatol*. 1990;95:530-6.

Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, Haegert A, Bell RH, et al. Superficial, nodular, and morpheiform basal-cell carcinomas exhibit distinct gene expression profiles. *J Invest Dermatol*. 2008;128:1797-805.

Zak-Prelich M, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A. Environmental risk factors predisposing to the development of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2004; 30:248-52.

Zhang JD, Ruschhaupt M, Biczok R. [internet] ddCt method for qRT – PCR data analysis The ddCt Algorithm. [Acesso em julho de 2013] Disponível em: <http://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/vignettes/ddCt/inst/doc/RT-PCR-Script-ddCt.pdf>. 2013;1-8 .

Zheng S, Guo Y, Mones JM. Basal cell carcinoma with myoepithelial differentiation. Review. Am J Dermatopathol. 2011;33:863-6.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS E MARCADORES INTRA E EXTRA-CELULARES NOS DIFERENTES SUBTIPOS MORFOLÓGICOS DE CARCINOMA BASOCELULAR

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: DRA ANDREZZA TELLES WESTIN

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CACILDA DA SILVA SOUZA;

COLABORADORES: PROFs. DRs. JOÃO SANTANA DA SILVA E EDSON GARCIA SOARES

O Sr(a). está sendo convidado a participar de estudo sobre tumor de pele, sendo o carcinoma basocelular (CBC) o mais comum. Este tumor tem o crescimento lento e ocorre mais em pessoas de pele clara com história de intensa exposição ao sol durante a vida. O tratamento mais indicado é a cirurgia para remover o tumor, mas há outros tratamentos alternativos. Como é importante conhecer mais sobre este tumor, o presente estudo tem a proposta de avaliar algumas das suas características (marcadores) do tecido, que possam estar associadas à sua agressividade, ou seja, crescimento mais rápido ou facilidade para reaparecer após tratamento.

PROCEDIMENTOS: Se Sr(a). concordar em participar do estudo, será necessária sua autorização para coletar amostras do tumor durante a cirurgia, procedimento mais indicado para tratar o seu problema. Você receberá anestesia local injetada na pele necessária para não sentir dor durante a cirurgia. Serão coletadas quatro amostras de 4mm, dois fragmento do tumor e dois da pele normal ao redor do tumor, durante a cirurgia e com a sua pele anestesiada. O procedimento não irá prejudicar, retardar ou alterar o seu tratamento (cirurgia) e o seguimento médico que você esteja realizando. Uma única coleta das amostras de pele está prevista para este estudo. Todo material extraído da sua pele será utilizado apenas para finalidade proposta neste estudo, e uso para outros fins deverá ter novamente a sua permissão. A fotografia da lesão não permitirá a sua identificação. O seu nome não será de forma alguma divulgado publicamente nos documentos deste estudo, que serão arquivados, e os seus dados são confidenciais e apenas o pesquisador responsável terá acesso ao número que identifica seu nome.

O Sr(a). não terá despesas extras para participar deste estudo. Caso haja outro convite ou proposta, o Sr(a). não é obrigado a aceitar ou permanecer, podendo desistir do estudo a qualquer momento, sem que isto prejudique o seu tratamento e atendimento médico.

O Sr(a). deverá entrar em contato com o responsável para qualquer esclarecimento relacionado aos procedimentos da pesquisa e poderá escolher se quer tomar conhecimento ou não do resultado do estudo

Data:

Dra. Andrezza Telles Westin – médica pós-graduanda do Departamento de Clínica Médica Hospital das Clínicas-FMRPUSP- Av.: Bandeirantes, 3900 – Mte Alegre Tel.: (16) 36022447

Assinatura: _____

Nome do participante: _____

Registro do participante: _____

APÊNDICE B - Valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para as IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-23, IFN- γ e FOXP3 em carcinomas basocelulares de acordo com seu subtipo histológico (n=26)

Tipo de tumor	$2^{-\Delta\Delta Cq}$							
	IL4	IL6	IL8	IL10	IL17	IL23	IFN- γ	FOXP3
CBCs	0,037	0,772	0,585	0,324	0,872	0,668	0,622	0,154
CBCs	0,123	0,367	0,625	0,764	4,389	0,261	1,621	0,180
CBCs	0,000	13,155	8,551	1,589	1,781	0,733	2,929	4,877
CBCs	0,047	0,494	3,419	2,107	2,124	0,000	2,154	0,025
CBCs	0,042	1,350	0,535	0,914	0,952	0,245	0,711	0,190
CBCs	0,000	3,985	1,047	0,351	5,733	0,120	0,507	1,013
CBCs	0,031	7,476	29,570	1,622	3,275	0,000	1,173	0,892
CBCs	0,030	1,066	24,458	3,472	1,403	0,492	1,732	0,068
CBCs	0,032	1,837	0,277	0,306	1,127	0,548	1,064	0,000
CBCs	0,000	0,000	15,244	1,519	4,826	1,124	1,195	12,762
CBCn	0,027	0,438	0,966	0,358	1,002	0,451	1,732	0,350
CBCn	0,025	8,305	0,755	0,460	3,447	0,000	1,120	0,184
CBCn	0,042	1,167	4,732	0,000	1,782	1,128	1,058	0,000
CBCn	0,000	0,453	3,800	0,875	2,446	0,875	0,000	0,534
CBCn	0,057	1,581	0,000	0,945	0,655	2,023	1,469	0,716
CBCn	0,130	0,563	0,238	0,000	3,231	3,344	0,000	0,000
CBCn	0,041	0,638	0,551	0,364	0,994	0,965	1,152	0,000
CBCn	0,128	0,858	2,389	-	1,725	0,000	1,097	0,155
CBCn	0,005	0,950	0,182	4,966	-	0,615	9,356	0,204
CBCn	0,109	1,512	0,717	1,683	0,904	0,020	2,319	0,000
CBCn	0,000	2,462	32,996	0,342	0,624	1,298	1,018	0,492
CBCn	0,000	0,478	2,280	0,929	2,057	1,487	1,579	0,035
CBCn	0,046	30,721	-	1,058	2,436	3,251	0,000	0,000
CBCn	0,036	9,185	46,228	-	1,411	0,000	0,000	0,000
CBCn	0,000	4,608	18,588	0,595	3,652	1,233	1,925	0,000
CBCn	0,000	6,295	46,227	3,715	1,951	1,233	13,220	0,000
Teste de Mann-Whitney (p)	0,88	0,68	0,97	0,61	0,43	0,06	0,79	0,06

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial;
 -: amostra contaminada por DNA.

APÊNDICE C - Valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para as IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-23, IFN- γ e FOXP3 em carcinomas basocelulares de acordo com sua distribuição topográfica (n=26)

Localização do tumor	$2^{-\Delta\Delta Cq}$							
	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-17	IL-23	IFN- γ	FOXP3
Cef	0,037	0,772	0,585	0,324	0,872	0,668	0,622	0,154
Cef	0,123	0,367	0,625	0,764	4,389	0,261	1,621	0,180
Cef	0,000	13,155	8,551	1,589	1,781	0,733	2,929	4,877
Cef	0,047	0,494	3,419	2,107	2,124	0,000	2,154	0,025
Cef	0,032	1,837	0,277	0,306	1,127	0,548	1,064	0,000
Cef	0,027	0,438	0,966	0,358	1,002	0,451	1,732	0,350
Cef	0,025	8,305	0,755	0,460	3,447	0,000	1,120	0,184
Cef	0,042	1,167	4,732	0,000	1,782	1,128	1,058	0,000
Cef	0,000	0,453	3,800	0,875	2,446	0,875	0,000	0,534
Cef	0,057	1,581	0,000	0,945	0,655	2,023	1,469	0,716
Cef	0,130	0,563	0,238	0,000	3,231	3,344	0,000	0,000
Cef	0,041	0,638	0,551	0,364	0,994	0,965	1,152	0,000
Cef	0,128	0,858	2,389	-	1,725	0,000	1,097	0,155
Cef	0,005	0,950	0,182	4,966	-	0,615	9,356	0,204
Cef	0,109	1,512	0,717	1,683	0,904	0,020	2,319	0,000
NCef	0,042	1,350	0,535	0,914	0,952	0,245	0,711	0,190
NCef	0,000	3,985	1,047	0,351	5,733	0,120	0,507	1,013
NCef	0,031	7,476	29,570	1,622	3,275	0,000	1,173	0,892
NCef	0,030	1,066	24,458	3,472	1,403	0,492	1,732	0,068
NCef	0,000	0,000	15,244	1,519	4,826	1,124	1,195	12,762
NCef	0,000	2,462	32,996	0,342	0,624	1,298	1,018	0,492
NCef	0,000	0,478	2,280	0,929	2,057	1,487	1,579	0,035
NCef	0,046	30,721	-	1,058	2,436	3,251	0,000	0,000
NCef	0,036	9,185	46,228	-	1,411	0,000	0,000	0,000
NCef	0,000	4,608	18,588	0,595	3,652	1,233	1,925	0,000
NCef	0,000	6,295	46,227	3,715	1,951	1,233	13,220	0,000
Teste de Mann-Whitney (p)	0,02	0,08	0,002	0,25	0,31	0,53	0,58	0,83

Legenda: CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; Cef: cefálico; NCef: não-cefálico; -: amostra contaminada por DNA.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 08 de junho de 2011

Ofício nº 1996/2011
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS E MARCADORES INTRA E EXTRACELULARES NOS DIFERENTES SUBTIPOS MORFOLÓGICOS DE CARCINOMA BASOCELULAR”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 325ª Reunião Ordinária realizada em 06/06/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 4892/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS datada de 21 de março de 2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
DRª ANDREZZA TELLES WESTIN
PROFª DRª CACILDA DA SILVA SOUZA (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica - Dermatologia

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ARTIGO

**EXPRESSÃO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G (HLA-G) EM
CARCINOMA BASOCELULAR****Andrezza Telles Westin¹, Edson Garcia Soares², Cacilda da Silva Souza³**

¹ Pós-graduanda do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

² Docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

³ Docente do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Introdução

A incidência impactante na população mundial e o aumento crescente do câncer de pele não-melanoma (Greinert et al., 2009) o torna um problema de saúde pública (Roewert-Huber et al., 2007). O carcinoma basocelular (CBC), neoplasia derivada das células não queratinizadas, corresponde a cerca de 75% dos cânceres cutâneos não-melanoma e mantém relação com a exposição à radiação ultravioleta, exagerada e intermitente ou cumulativa (Armstrong; Ridker, 1995; Gailani et al., 1996).

São mais frequentes a partir da sexta década de vida, com discreta prevalência do sexo masculino (Gallagher et al., 1990; Miller et al., 1994; Karagas et al., 1999; Chinem e Miot, 2011; Jurciukonyte, 2013). As áreas fotoexpostas da face, do couro cabeludo e do pescoço são as principais regiões acometidas, cerca de 20% dos casos envolvem o nariz e 17% o restante da face (Crowson, 2006).

De crescimento lento e localmente invasivo. apresenta elevadas chances de cura, se detectado precocemente. Porém, sem tratamento, a invasão local e o dano tecidual são consideráveis, e resultam no comprometimento da função e da estética, particularmente da face, pescoço e couro cabeludo (Telfer et al., 2008).

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) consiste em moléculas não clássicas do complexo de histocompatibilidade (MHC) Ib (Schwab et al., 1988; Yan, 2011). Diferentemente das moléculas de HLA clássicas, o HLA-G executa,

exclusivamente, funções imunossupressoras, que modulam através de múltiplos mecanismos a imunidade inata e adquirida (Le Gal et al., 1999).

Primariamente presente no trofoblasto placentário, HLA-G é responsável pela tolerância materno-fetal. A sua expressão tem sido descrita em várias neoplasias malignas, tais como carcinomas de células renais, de mama e de grandes células do pulmão, glioblastoma, linfomas de células B cutâneos, cânceres colorretais e melanoma (Rouas-Freiss et al., 2005). Rebmann et al. (2007) sugeriram que a expressão do HLA-G representa uma forma das células tumorais evadirem o sistema imune do hospedeiro de forma similar ao que ocorre com as células fetais invadindo a decídua sob a tolerância imunológica materna no período gestacional.

No presente estudo, buscamos analisar a expressão do HLA-G, seus possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos nos diferentes padrões de crescimento e de invasão tecidual do CBC.

Pacientes e Métodos

Os participantes do estudo foram convidados e selecionados durante o Ambulatório de Tumores Cutâneos do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCRP) – Universidade de São Paulo (USP). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e seguiu a Declaração de Helsinki.

Indivíduos com diagnóstico de CBC, idade superior a 18 anos e concordantes com a participação foram incluídos no estudo. Durante o procedimento de exérese, fragmentos com características clínicas mais evidentes da periferia do tumor foram coletados com punçador (*punch*) de 4 mm.

Foram incluídas no estudo 26 amostras de fragmentos de CBC, 10 de CBC superficial (CBCs) e 16 de CBC nodular (CBCn), para análise da expressão do HLA-G através de imunoistoquímica (IHQ).

Cortes parafinados de 4µm de espessura de fragmentos do tumor foram submetidos a etapas consecutivas de desparafinização e à reação de IHQ, por meio do HRP-polímero (Mach 4 Universal HRP-Polymer kit with DAB; Biocare Medical, CA, USA). O anticorpo HLA-G monoclonal (clone MEM-G/1, Exbio) foi utilizado na concentração 1/100.

Um sistema de análise de imagem compreendido por microscópio (OLYMPUS BX50), câmera colorida (OLYMPUS DP10) e computador com o software (Image Pro Plus, versão 6.0 - Media Cybernetics) foi empregado para a análise quantitativa da imunomarcagem do HLA-G nos cortes histológicos. A média de 8 a 10 campos com células marcadas foi selecionada de cada lâmina. A presença de imunoprecipitado castanho citoplasmático das células epiteliais ou imunes foi considerada como marcação positiva. A porcentagem de expressão IHQ para HLA-G foi estabelecida pela quantificação de células positivas em 1.000 células/biópsias. Foram analisadas as percentagens de células imunomarcadas nos sítios perineoplásicos e de células neoplásicas. Na presença

de imunomarcção de células neoplásicas, a intensidade de impregnação pelo marcador HLA-G foi classificada em leve, moderada ou acentuada.

Para análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad InStat3 (Graphpad Software, INC, CA, USA). A análise das variáveis categóricas sexo (feminino/masculino) e marcação de células neoplásicas (sim/não) foi feita pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2). O teste de normalidade de D'Agostino e de Pearson foi aplicado para averiguar a distribuição normal das amostras. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi empregado para comparar as porcentagens médias de células marcadas nas diferentes intensidades dentre os distintos subtipos.

Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

Resultados

A análise histopatológica descritiva e qualitativa dos cortes corados com hematoxilina-eosina (HE) mostrou que os CBCn apresentaram um infiltrado inflamatório mais evidente e concentrado ao redor da neoplasia (Figuras 1 e 2). Já nos CBCs, o infiltrado inflamatório mostrou-se difusamente distribuído por toda a derme, tornando-se mais denso nas áreas de proximidade da neoplasia. (Figuras 3 e 4). Em ambos os subtipos, foi possível encontrar grandes quantidades de linfócitos, de macrófagos, de mastócitos, e alguns poucos eosinófilos compondo esse infiltrado inflamatório.

Todas as amostras apresentaram imunomarcção para HLA-G nos sítios perineoplásicos (PN) e nas células neoplásicas (Cneo), sendo mais intensa e evidente no infiltrado PN em relação ao de Cneo. A expressão do infiltrado inflamatório ocorreu prioritariamente no infiltrado que se encontrava ao redor dos ninhos de células neoplásicas. Frequentemente, a marcação do infiltrado inflamatório PN dérmico estendeu-se até áreas de ausência do tumor. Raramente, foi notada marcação do infiltrado inflamatório dérmico imediatamente abaixo de epiderme normal, no entanto, houve ausência de expressão de todos os marcadores na epiderme normal.

A frequência de positividade de expressão de células neoplásicas HLA-G (100%) compreendeu em **intensidade leve a acentuada**. Foi mais elevada em **intensidade leve** para HLA-G (100%), seguida de **intensidade moderada** (73,1%) e **acentuada** (23,1%); e as porcentagens médias de células marcadas foram de 38,1%, 32,1% e 13,3%, respectivamente (Figura 5a). Apenas a porcentagem média das células neoplásicas marcadas em **intensidademoderada** por HLA-G foi significativamente maior no CBCn comparada ao CBCs ($p=0,04$) (Tabela 1).

A porcentagem média de células marcadas para HLA-G no infiltrado perineoplásico foi de 53,85%. Não houve diferença estatística significativa entre as porcentagens de células imunomarcadas para HLA-G nos diferentes subtipos

tumorais, CBCn e CBCs ($p=$, OR , IC), e localizações, cefálica e não-cefálica ($p=$ 0,91; OR 0,79; IC 0,01-43,12) (Figuras 5b e c).

Discussão

Desde a primeira descrição do CBC por Jacob em 1827, sua incidência vem progressivamente aumentando (Armstrong; Ridker, 1995; Staples et al., 2006; Jemal et al., 2008). Em decorrência da sua relevância epidemiológica, desperta-se o interesse no entendimento dos mecanismos envolvidos no microambiente tumoral, que podem potencialmente permitir o desenvolvimento de novas ferramentas preventivas e terapêuticas.

A resposta imune humana contra o CBC não é capaz de eliminá-lo, porém tanto a resposta imune inata quanto a adquirida tem seu papel na vigilância contra tumores. A interação entre linfócitos T e as células apresentadoras de antígeno, assim como a relação dos linfócitos T citotóxicos com os linfócitos T helper e também a ação dos linfócitos T CD4⁺ (secretores de citocinas) e dos linfócitos T CD8⁺ (efetores citotóxicos) são essenciais tanto para resposta contra o CBC quanto para o desenvolvimento de mecanismos para regressão do CBC (Gaspari; Sauder, 2003).

Os defeitos no HLA clássico resultam na resistência das células neoplásicas à ação dos linfócitos citotóxicos. As modificações sofridas por células neoplásicas levam à perda do HLA de classe I, tornando-as suscetíveis à destruição pelas NK. Acredita-se que as células tumorais primeiramente iniciam a expressão de HLA inibitórios para então perderem a expressão dos HLA de classe I (Urosevic; Dummer, 2008). Rebmann et al. (2007) sugeriram que tanto o aumento na expressão do HLA-G, como a perda do HLA clássico são responsáveis pelos mecanismos de escape imune tumoral.

O HLA-G executa funções imunossupressoras que modulam a imunidade inata e adquirida através de múltiplos mecanismos (Le Gal et al., 1999). A expressão do HLA-G tem sua transcrição regulada em várias linhagens de células tumorais por citocinas, tais como a IL-10, o TNF- α e o INF- γ (Urosevic; Dummer, 2003 [a]).

Na comparação entre lesões melanocíticas malignas e benignas, a expressão de HLA-G se demonstrou ser maior no melanoma comparada aos nevos ($p<0,0003$), e a superexpressão estaria associada à transformação maligna (Ibrahim et al., 2004).

Na análise da expressão do HLA-G em lesões malignas e benignas de transplantes renais, a proteína foi expressa apenas nos tumores malignos epiteliais, sendo 14% dos CBC, e ausente em todas as lesões benignas, demonstrando a expressão restrita do HLA-G às lesões malignas (Aractingi et al., 2003).

A expressão do HLA-G é bem marcante no CBC, e evidenciada nas células neoplásicas e nos sítios perineoplásicos em todas as nossas amostras, prioritariamente no infiltrado ao redor das células tumorais. O raro encontro da

expressão do HLA-G no infiltrado inflamatório dérmico abaixo de epiderme normal revela a sua relação mais estreita com as células tumorais. A imunomarcagem perineoplásica mais evidente que a de células neoplásicas sugere a participação da molécula HLA-G com possíveis ações supressoras na interface do tumor com tecidos normais, que permitiriam a invasão tumoral.

Previamente, Urosevic e Dummer (2003 [b]) demonstraram a expressão da proteína HLA-G em CBC primários, sendo mais acentuada em formas agressivas (CBC esclerodermiforme) comparadas às não agressivas (CBCn e CBCs). Embora, nossos achados tenham evidenciado uma porcentagem maior de células neoplásicas marcadas com intensidade moderada nos CBCn comparadas aos CBCs ($p=0,04$), não foi possível determinar outros parâmetros de distinção do comportamento entre estes subtipos.

Na análise da expressão do HLA-G e o impacto na recorrência de uma série de CBC, Urosevic e colaboradores (2005) demonstraram a presença de HLA-G em 90% dos tumores ($n=47$). Os CBCn primários apresentaram predominância na expressão do HLA-G; enquanto nos tumores recidivados, os CBC esclerodermiformes superavam os demais na expressão da molécula. Os tumores não recorrentes após a radioterapia expressavam HLA-G nas células inflamatórias peritumorais; e aqueles com o maior tempo livre de recorrência apresentavam essas células positivas para HLA-G. Dessa forma, concluíram que o HLA-G parece estar associado ao fenótipo agressivo, assim como já demonstrado em outros tipos de câncer.

Nossos achados corroboram a presença de expressão de HLA-G no CBC, e sua possível ação imunomoduladora, contribuindo para o escape de células tumorais.

Referências

- Aractingi S, Kanitakis J, Euvrard S, Le Danff C, Carosella ED. Selective expression of HLA-G in malignant and premalignant skin specimens in kidney transplant recipients. *Int J Cancer*. 2003;106:232-5.
- Armstrong BK, Kricger A. Skin cancer. Review. *Dermatol Clin*. 1995;13:583-94.
- Chinem VP, Miot HA. Epidemiologia do carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 2011;86:292-305.
- Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. Review. *Mod Pathol*. 2006;19:127-47.
- Gailani MR, Leffell DJ, Ziegler AM, et al. Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:349-54.
- Gallagher RP, Ma B, McLean DI, Yang CP, Ho V, Carruthers JA, et al. Trends in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma of the skin from 1973 through 1987. *J Am Acad Dermatol*. 1990;23:413-21.
- Gaspari AA, Sauder DN. Immunotherapy of basal cell carcinoma: evolving approaches. Review. *Dermatol Surg*. 2003;29:1027-34.
- Greinert R. Skin cancer: new markers for better prevention. Review. *Pathobiology*. 2009;76:64-81.
- Ibrahim EC, Aractingi S, Allory Y, Borrini F, Dupuy A, Duvillard P, et al. Analysis of HLA

- antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that up regulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer*. 2004;108:243-50.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *Cancer J Clin*. 2008; 58:71-96.
- Jurciukonyte R, Vincerzevskiene I, Krilaviciute A, Bylaite M and Smailyte G. Epidemiology of basal cell carcinoma in Lithuania, 1996-2010. *British Journal of Dermatology*. 2013;169:1100-5.
- Karagas MR, Greenberg ER, Spencer SK, Stukel TA, Mott LA. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int J Cancer*. 1999;81:555-9.
- Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, Dausset J, et al. HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol* 1999;11:1351-6.
- Miller DL, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol*. 1994;30:774–8.
- Presser SE, Taylor JR. Clinical diagnostic accuracy of basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol*. 1987;16 (5 PN 1):988-90.
- Rebmann V, Wagner S, Grosse-Wilde H. HLA-G expression in malignant melanoma. Review. *Semin Cancer Biol*. 2007;17:422-9.
- Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. Review. *Br J Dermatol*. 2007;157:47-51.
- Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res*. 2005;65:10139-44.
- Schwab R, Weksler ME, Russo C. CD3 pathway of T-cell activation. II. Role of HLA-class I molecules in early events. *Cell Immunol*. 1988;115:310-24.
- Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J Am Acad Dermatol*. 1990;23:1118-26.
- Staples MP, Elwood M, Burton RC, Willians JL, Marks R, Giles GG. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*. 2006;184:6-1.
- Telfer NR, Colver GB, Morton CA; British Association of Dermatologists. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. Review. *Br J Dermatol*. 2008;159:35-48.
- Urošević M, Dummer R. HLA-G and IL-10 expression in human cancer - different stories with the same message. Review. *Semin Cancer Biol*. 2003;13:337-42 (a).
- Urošević M, Dummer R. HLA-G in skin cancer: a wolf in sheep's clothing? Review. *Hum Immunol*. 2003;64:1073-80. (b)
- Urošević M, Kempf W, Zagrodnik B, Panizzon R, Burg G, Dummer R. HLA-G expression in basal cell carcinomas of the skin recurring after radiotherapy. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30:422-5.
- Wolf DJ, Zitelli JA. Surgical margins for basal cell carcinoma. *Arch Dermatol*. 1987;123:340-4.
- Yan WH. HLA-G expression in cancers: potential role in diagnosis, prognosis and therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011;11:76-89.
- Zak-Prelich M, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A. Environmental risk factors predisposing to the development of basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2004; 30:248-52.

Figura 1 - Aspectos histológicos e imunomarcção para HLA-G em amostra de CBCn
 (a) HE (10X) CBCn com intenso infiltrado inflamatório PN; (b) IHQ HLA-G (10X) imunomarcção de células neoplásicas e das células do infiltrado PN; (c) IHQ HLA-G (40X) magnificação da imunomarcção citoplasmática de células neoplásicas de intensidade moderada e acentuada; (d) IHQ HLA-G (40X) melhor visualização da imunomarcção PN.

Figura 2 - Aspectos histológicos e imunomarcção em amostra de CBCn
 (a) HE (4X) CBCn com transformação cribiforme; (b) IHQ HLA-G (20X) não há imunomarcção de células neoplásicas e do infiltrado linfocítico nessa porção tumoral; (c) HE (4X) porção sem transformação cribiforme da mesma neoplasia; (d) IHQ HLA-G (20X) nessa área há imunomarcção de células neoplásicas de intensidade leve e PN discreta.

Figura 3 - Aspectos histológicos e imunomarcção para HLA-G em amostra de CBCs (a) HE (20X) CBCs pigmentado, observa-se a melanina; (b) IHC HLA-G (20X) imunomarcção de Cneo de intensidade moderada e acentuada, e infiltrado PN com intensa imunoexpressão; (c) IHC HLA-G (40X) coloração em área anteriormente não corada pela melanina, confirmando a imunoexpressão; (d) IHC HLA-G (40X) detalhe da imunomarcção PN.

Figura 4 - Aspectos histológicos e imunomarcção para HLA-G em amostras de CBCs (a) HE (10X) CBCs infiltrativo com discreto infiltrado inflamatório PN; (b) IHC HLA-G (10X) imunomarcção neoplásica e PN; (c) IHC HLA-G (20X) magnificação da imunomarcção de células neoplásicas de intensidade leve (círculo preto) e moderada (círculos brancos); (d) IHC HLA-G (40X) melhor visualização da imunomarcção PN, com marcação de macrófagos (setas brancas) e marcação de linfócitos (setas pretas).