UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Bruno de Carvalho Fantini

**PREDITORES DA EXTENSÃO SUBCLÍNICA E DO NÚMERO DE
FASES DA CIRURGIA MICROGRÁFICA DE MOHS NO
CARCINOMA BASOCELULAR**

**Ribeirão Preto
2015**

BRUNO DE CARVALHO FANTINI

**PREDITORES DA EXTENSÃO SUBCLÍNICA E DO
NÚMERO DE FASES DA CIRURGIA MICROGRÁFICA DE
MOHS NO 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

Ribeirão Preto

2015

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fantini, Bruno de Carvalho

Preditores da extensão subclínica e do número de fases da
cirurgia micrográfica de Mohs no carcinoma basocelular.
Ribeirão Preto, 2015.

170 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. Neoplasia Residual. 3. Cirurgia de
Mohs. 4. Recidiva Local de Neoplasia. 5. Imuno-histoquímica

Fantini BC. **Preditores da extensão subclínica e do número de fases da cirurgia micrográfica de Mohs no carcinoma basocelular.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Clínica Médica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

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

Assinatura: _____

Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes – UNICAMP

Assinatura: _____

Profa. Dra. Fernanda Maris Peria – FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luiz Carlos Conti de Freitas – FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Pedro Soler Coltro – FMRP-USP

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A meus pais, Aldo e Mariza, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos as oportunidades para realizarem seus sonhos e suas conquistas.

A minha irmã Paula e todos da minha família, que sempre me apoiaram em todos os desafios.

A minha esposa Cilene, companheira e amiga, que com muita paciência e carinho sempre me incentivou nos momentos mais difíceis.

A meus filhos Lucas e Laís, que tanto contribuíram, mesmo sem se darem conta, iluminando meus dias.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza, minha eterna gratidão por sua orientação. Com muita paciência, apoio e incentivo esteve sempre presente nos momentos de dificuldades e intercorrências no desenvolvimento dessa tese, permitindo alcançar mais esta conquista.

Ao meu amigo Roberto Bueno Filho, que com seu companheirismo e dedicação muito me incentivou e ajudou nesta conquista.

Ao Prof. Dr. Fernando Chahud, por nos acolher em seu laboratório.

Ao Abel Dorigan Neto, pela amizade e por tornar possível, em conjunto com toda a equipe da patologia, a realização da cirurgia micrográfica de Mohs no HCRP.

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

À Mônica Abreu, do laboratório de Patologia do HCRP, pela contribuição no desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica.

Ao Antônio Renato Meirelles e Silva, do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da FMRP-USP, pela paciência em nos ensinar a captar as imagens das lâminas e deixar da melhor forma possível a análise com o Image J.

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 para esse trabalho, seja através da presença, do contato, da ajuda no dia-a-dia ou do apoio emocional, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

RESUMO

Fantini BC. Preditores da extensão subclínica e do número de fases da cirurgia micrográfica de Mohs no carcinoma basocelular. [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2015. 170 f.

Introdução: O carcinoma basocelular (CBC) é o tipo mais comum de câncer da pele não-melanoma na população mundial. A elevada prevalência do acometimento da face determina elevada morbidade, a despeito da baixa taxa de mortalidade. Localização, dimensão, subtipo histológico, recidiva e delimitação imprecisa relacionam-se ao risco de invasão e destruição local, sendo critérios de indicação da cirurgia micrográfica de Mohs (CMM), padrão ouro para tratamento do CBC, por elevadas taxas de cura e preservação de tecido sadio. **Objetivo:** Analisar possíveis preditores da extensão subclínica e do número de fases da CMM para o CBC, em conjunto com o emprego de imuno-histoquímica (IHQ). **Métodos:** Amostra de 101 casos de CBC excisados por CMM, delimitados previamente por dermatoscopia, foi analisada quanto ao perfil demográfico, características e possíveis relações entre as variáveis determinantes do risco para realização de duas ou mais e três ou mais fases na CMM. Marcação por IHQ dos anticorpos Ber-EP4, MNF-116, E-Caderina e VEGF foi realizada em onze casos de diferentes subtipos do CBC. **Resultados:** Na amostra, com 49,5% de tumores recidivados, predominou o sexo feminino (58,4%), com idade média de 60,2 anos e localização no segmento cefálico, sendo 52,5% dos tumores na região nasal. Subtipo histológico de alto risco em 69,3%, sendo 64,7% entre os primários e 74% entre os recidivados. Em 46,5% evidenciou-se mais de um tipo histológico, coexistindo baixo e alto risco em 33,7%; 97% apresentou mais de um critério de risco para indicação de CMM, predominando a localização em 91,1%, sendo baixas aquelas por delimitação imprecisa (12,9%) e margens comprometidas (6,9%); 60,4% dos tumores foram removidos por uma fase cirúrgica, 39,6% por duas ou mais e 10,9% por três ou mais. Recidiva elevou as chances de ≥ 2 fases para remoção completa ($OR=2,40$ I.C.95% 1,06 – 5,44; teste do $X^2 = 4,47$, $p = 0,03$), assim como localização na região nasal e zona H ($p = 0,04$ e $p = 0,056$, respectivamente). O maior número de critérios elevou as chances de ≥ 2 fases e ≥ 3 fases ($p = 0,02$ e $p = 0,03$, respectivamente). As intensidades de marcação com Ber-EP4 e E-Caderina foram mais acentuadas no subtipo micronodular comparadas ao esclerodermiforme. Todos os marcadores evidenciaram os ninhos neoplásicos multifocais dispersos e em meio ao intenso processo inflamatório. O VEGF, mostrou marcação mais intensa e evidente no infiltrado inflamatório perineoplásico. **Conclusões:** A coexistência de padrões e predomínio do alto risco nos CBC primários e recorrentes evidenciam potenciais causas de recidiva, invasão e destruição, e da indicação da CMM. Localização cefálica e recorrência são critérios que corroboraram tal indicação e, o maior número de critérios presentes, a predição da extensão subclínica. A dermatoscopia auxiliou na delimitação pré-cirúrgica do CBC. Idade avançada pode exigir mais fases para remoção do CBC. Marcadores imunohistoquímicos podem ser úteis para evidenciar a neoplasia nos tecidos ou em meio a processo inflamatório. O reconhecimento de fatores preditivos é auxiliar na decisão terapêutica, no planejamento cirúrgico e na obtenção das altas taxas de cura por meio da CMM.

Palavras-chave: Carcinoma Basocelular. Neoplasia Residual. Cirurgia de Mohs. Recidiva Local de Neoplasia. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Fantini, BC. Predictors of subclinical spread and number of stages in Mohs micrographic surgery for treatment of basal cell carcinoma. [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2015. 170p.

Introduction: Basal cell carcinoma (BCC) is the most common type of non-melanoma skin cancer and the most frequently occurring form of cancer worldwide. BCC occurs mostly on the face, and despite low mortality rate, it generates high morbidity. Some features such as size, histological subtype, location, recurrence, poor delimitation and others are predictors of recurrence. Mohs micrographic surgery (MMS) is the gold-standard treatment for BCC. It has the highest cure rates and causes less damage to healthy tissue than other options. **Objective:** This study aims to analyze predictors of subclinical spread and number of stages in MMS for removing BCC and the use of immunohistochemistry (IHC). **Methods:** We selected 101 patients with BCC and indication for MMS. Analyzed the demographic profile of the patients and relations between the characteristics of tumor risk and number of surgical stages (one, two or more and three or more stages). Immunostaining (Ber-EP4 antibodies, MNF-116, E-Cadherin and VEGF) was performed in 11 BCC with different histological subtypes. **Results:** Among 101 BCC, 49,5% was recurrent. There was a female predominance (58.4%) with mean age of 60.2. There was also a predominance on the face, most of them located on the nose (52,5%). Histological types with high risk of recurrence predominated (69.3%), 64,7% among primary and 74% among recurrent ones. 46.5% tumors had more than one histological type, with low and high risk in the same lesion in 33.7%. Most BCC (97%) had more than one criteria to be treated by MMS and location was the most frequent (91,1%). Poorly defined (12.9%) and positive margins (6.9%) occurred only in a few cases. 60,4% were removed by one surgical stage; 39,6% by ≥ 2 and 10,9% needed ≥ 3 stages. Among recurrent BCC, the chance of ≥ 2 surgical stages was 2,4 times compared to primary tumors ($p = 0,03$). BCC located on nasal region and "mask areas" of the face were also associated with ≥ 2 stages ($p = 0.04$ and $p = 0.056$, respectively). The number of criteria was also associated with ≥ 2 and ≥ 3 stages ($p = 0.02$ and $p = 0.03$, respectively). Intensity of Ber-EP4 and E-Cadherin were more pronounced in micronodular subtype compared to morpheaform. In areas with intense inflammatory cell infiltrate, anti-Ber-EP4, anti-MNF116 and anti-E-Cadherin were useful to highlight the neoplastic cells. Anti-VEGF showed up clearly in the inflammatory infiltrate around tumor. **Conclusion:** Mixed histopathological pattern observed in many tumors and predominance of high-risk histology in primary and recurrent BCC highlight potential causes of recurrence, invasion, destruction, and indication for MMS. Location and recurrence stood out as a criterion for MMS and a greater number of criteria was associated with subclinical extension of the BCC. Age was also associated with an increased number of stages. Dermoscopy helped in the demarcation of surgical margins. As for the IHC, it would be useful to highlight BCC in areas with intense inflammation. Recognition of predictive factors is

important in therapeutic decision, surgical planning and to obtain the highest cure rates by MMS.

Key-Word: Basal Cell Carcinoma. Neoplasm, Residual. Mohs surgery. Neoplasm Recurrence, Local. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Aspectos clínicos do CBC.....	30
Figura 02 -	Aspecto clínico do CBC excedendo 5cm e CBC esclerodermiforme.....	31
Figura 03 -	Aspecto histopatológico do CBC.....	33
Figura 04 -	Invasão perineural.....	36
Figura 05 -	Algoritmo para tratamento do CBC.....	48
Figura 06 -	Dermatoscopia para delimitação prévia do CBC submetido à CMM.....	64
Figura 07 -	Demarcação da área cicatricial a ser removida por CMM.....	64
Figura 08 -	Enucleação da lesão “debulking”.....	65
Figura 09 -	Demarcação da lesão na pele, marcas de referência e mapa.....	67
Figura 10 -	Retirada da primeira fase cirúrgica, codificação e mapeamento.....	68
Figura 11 -	Cortes no criostato.....	69
Figura 12 -	Formas de reconstrução da ferida cirúrgica.....	70
Figura 13 -	Delimitação do tumor através da seleção automática no <i>software</i> Image J v1.49.....	73
Figura 14 -	Conversão da imagem para 8-bit.....	74
Figura 15 -	Determinação de porcentagem da área imunomarcada pelos anticorpos através de limiar de detecção.....	75
Figura 16 -	Fórmula para transformação de escala de cinza em intensidade de marcação.....	76
Figura 17 -	Exemplo de contagem de células marcadas com o anticorpo anti-VEGF.....	77
Figura 18 -	CBC esclerodermiforme recidivado após cirurgia e radioterapia acometendo a região nasal.....	82
Figura 19 -	Coexistência de múltiplos padrões histológicos nos CBC excisados.....	86

Figura 20 -	CBC incompletamente removido submetido à CMM.....	89
Figura 21 -	Retalho em rotação.....	101
Figura 22 -	Retalho em Transposição.....	102
Figura 23 -	Enxerto de pele total.....	103
Figura 24 -	Fechamento primário.....	104
Figura 25 -	Fechamento por segunda intenção.....	105
Figura 26 -	Enxerto de Burrow.....	106
Figura 27 -	Aspectos histológicos e imunomarcção para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC superficial.....	109
Figura 28 -	Aspectos histológicos e imunomarcção para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC nodular.....	110
Figura 29 -	Aspectos histológicos e imunomarcção para Ber-EP4 e MNF116 e E-Caderina em CBC nodular e micronodular.....	111
Figura 30 -	Aspectos histológicos e imunomarcção para Ber-EP4 e MNF116 e E-Caderina em CBC esclerodermiforme com componente superficial.....	112
Figura 31 -	Aspectos da imunomarcção para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC infiltrativo com intenso infiltrado inflamatório.....	113
Figura 32 -	Aspectos da imunomarcção para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC esclerodermiforme com intenso infiltrado inflamatório.....	114
Figura 33 -	Aspectos da imunomarcção para VEGF em CBC com componentes esclerodermiforme, micronodular e nodular.....	115
Figura 34 -	Estabelecimento de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas pela IHQ em CBC nodular.....	116
Figura 35 -	Estabelecimento de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas pela IHQ em CBC esclerodermiforme.....	117

Figura 36 -	Estabelecimento de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas pela IHQ em componente nodular de CBC.....	118
Figura 37 -	Aspectos histológicos e imunomarcação para VEGF em amostras de CBC nodular e esclerodermiforme.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Fatores que influenciam no prognóstico dos CBC.....	32
Tabela 02 -	Fatores que classificam o CBC como de alto risco.....	42
Tabela 03 -	Relação dos anticorpos primários.....	72
Tabela 04 -	Dados demográficos dos indivíduos com CBC submetidos à CMM.....	79
Tabela 05 -	Características dos CBC (n=101) submetidos à CMM em acordo com o risco histológico.....	83
Tabela 06 -	Características dos CBC (n=101) submetidos à CMM em acordo com o número de componentes e o padrão histopatológico predominante.....	85
Tabela 07 -	Motivos da indicação da CMM para os CBC excisados.....	90
Tabela 08 -	Distribuição dos CBC excisados segundo o número de fases na CMM, recidiva e padrão do risco histológico.....	91
Tabela 09 -	Distribuição das formas de reconstrução segundo o maior diâmetro do defeito cirúrgico final das CMM.....	108
Tabela 10 -	Valores médios da intensidade, percentuais de área marcada e escores obtidos com Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina de CBC excisados por CMM.....	119
Tabela 11 -	Médias e desvio padrão da contagem do total de células inflamatórias na região peritumoral nos tipos histológicos de CBC.....	121

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 -	Distribuição segundo sexo dos CBC excisados (n=101) por CMM.....	80
Gráfico 02 -	Distribuição por faixa etária dos indivíduos com CBC submetidos à CMM.....	80
Gráfico 03 -	Distribuição dos CBC submetidos à CMM (n=101) em acordo com a topografia.....	81
Gráfico 04 -	Distribuição dos CBC (n=101) submetidos à CMM segundo a condição de primário ou recidivado.....	82
Gráfico 05 -	Distribuição dos CBC submetidos à CMM (n=101) em acordo com o risco histológico.....	84
Gráfico 06 -	Relação entre a condição de primário ou recidivado e o risco determinado pelo padrão histológico dos CBC excisados (n=101) por CMM.....	84
Gráfico 07 -	Distribuição segundo o subtipo histológico e o risco determinado pelo padrão histológico dos CBC excisados por CMM (n=101).....	87
Gráfico 08 -	Relação entre a condição de primário ou recidivado e os padrões histopatológicos predominantes nos CBC submetidos a CMM (n=101).....	88
Gráfico 09 -	Relação entre o número de critérios para indicação de CMM e o número de fases cirúrgicas para completa remoção dos CBC excisados (n=101).....	90
Gráfico 10 -	Relação entre o número de fases para completa remoção do tumor e a condição de primário ou recidivado dos CBC excisados por CMM (n=101).....	92
Gráfico 11 -	Relação entre o número de fases cirúrgicas para completa remoção do tumor e a idade dos pacientes submetidos à CMM (n=101).....	93
Gráfico 12 -	Relação entre número de fases para completa remoção e padrão de risco histológico e tipo histológico predominante dos CBC excisados por CMM (n=101).....	94

Gráfico 13 -	Relação entre número de fases para completa remoção e localização dos CBC excisados por CMM (n=101).....	95
Gráfico 14 -	Relação entre a dimensão dos CBC excisados (n=101) e o número de fases (≥ 2) realizadas na CMM.....	96
Gráfico 15 -	Relação entre a dimensão dos CBC (n=101) e o número de fases (≥ 3) realizadas na CMM.....	97
Gráfico 16 -	Proporção de aumento do defeito cirúrgico em relação à dimensão inicial dos CBC excisados por CMM (n=101).....	98
Gráfico 17 -	Relação entre tratamento prévio por radioterapia e o número de fases realizadas na CMM para tratamento dos CBC (n=4)	99
Gráfico 18 -	Relação entre a variação do tamanho da ferida cirúrgica e o tratamento prévio por radioterapia dos CBC excisados por CMM (n=4).....	100
Gráfico 19 -	Distribuição dos CBC excisados (n=101) por CMM em acordo com a forma de reconstrução do defeito cirúrgico.....	107

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>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CBC	Carcinoma basocelular
CBCn	Carcinoma basocelular nodular
CBCs	Carcinoma basocelular superficial
CEC	Carcinoma espinocelular
CMM	Cirurgia micrográfica de Mohs
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	Desvio padrão
ed.	Edição
et al.	E outros
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina-eosina
H&E	Hematoxilina-eosina
IFN	Interferon
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina

INCA	Instituto Nacional de Câncer
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NK	Células <i>Natural Killer</i>
PBS	Solução salina (<i>phosphate buffered saline</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RUV	Radiação ultravioleta
SERPAT	Serviço de Patologia
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th	linfócitos T auxiliares (<i>T helper</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral
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

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Carcinoma Basocelular	24
1.1.1 Epidemiologia	24
1.1.2 Etiopatogenia	25
1.1.3 Manifestações clínicas	27
1.1.3.1 Carcinoma basocelular nodular (CBCn)	28
1.1.3.2 Carcinoma basocelular superficial (CBCs)	28
1.1.3.3 CBC esclerodermiforme ou <i>morfeia-like</i>	29
1.1.3.4 Outros tipos clínicos	29
1.1.4 Diagnóstico e prognóstico	31
1.1.5 Histopatologia	32
1.1.5.1 CBCn	34
1.1.5.2 CBCs	34
1.1.5.3 CBC micronodular	34
1.1.5.4 CBC esclerodermiforme	35
1.1.5.5 Outros subtipos histopatológicos	35
1.1.6 Opções terapêuticas	36
1.1.6.1 Cirurgia convencional	38
1.1.6.2 Cirurgia micrográfica de Mohs (CMM)	39
1.1.6.3 Curetagem e eletrocoagulação	43
1.1.6.4 Criocirurgia	44
1.1.6.5 Terapia tópica (Imiquimode, 5-Fluorouracil, Mebutato de ingenol e Terapia fotodinâmica)	45
1.1.6.6 Vismodegibe	46
1.1.6.7 Radioterapia	47
1.2 Fatores de risco no carcinoma basocelular	48
1.2.1 Preditores de incidência do carcinoma basocelular	49
1.2.2 Preditores do desenvolvimento de múltiplos carcinomas basocelulares	49
1.2.3 Preditores de recorrência do carcinoma basocelular	50

1.3 Marcadores biológicos do carcinoma basocelular.....	51
1.3.1 Antígeno epitelial (Clone Ber-EP4).....	52
1.3.2 Citoqueratina humana (Clone MNF116).....	53
1.3.3 Proteína transmembrana de adesão cálcio-dependente de epitélio (E-Caderina)	54
1.3.4 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	55
2 OBJETIVOS	58
2.1 Objetivo geral.....	58
2.2 Objetivos específicos.....	58
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	61
3.1 Procedimentos gerais.....	61
3.2 Amostragem e casuística do estudo.....	62
3.3 Cirurgia micrográfica de Mohs (CMM).....	63
3.3.1 Princípios do método.....	63
3.3.2 Execução do método.....	63
3.4 Análise imuno-histoquímica (IHQ).....	71
3.4.1 Princípios do método.....	71
3.4.2 Execução do método.....	71
3.5 Análise Estatística.....	77
4 RESULTADOS	79
4.1 Análise descritiva.....	79
4.2 Imunomarcção de carcinomas basocelulares excisados por CMM.....	108
5 DISCUSSÃO	123
6 CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS	134
APÊNDICES	149
ANEXOS	151
ARTIGO	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma basocelular

1.1.1 Epidemiologia

O carcinoma basocelular (CBC) é o tipo mais comum de câncer de pele não-melanoma, neoplasia maligna mais frequente na população mundial (Greinert et al., 2009). Apesar da taxa de mortalidade ser extremamente baixa, gera um elevado custo ao sistema de saúde e grande morbidade, uma vez que a maior parte das lesões ocorrem em áreas expostas como cabeça e pescoço, acometendo principalmente a face (Lomas et al. 2012). Além disso, o aumento de 3 a 10% ao ano na sua incidência o torna um problema de saúde pública (Roewert-Huber et al., 2007). O envelhecimento da população, mudanças comportamentais em relação ao sol com atividades recreacionais e a diminuição da camada de ozônio são alguns dos fatores implicados no aumento constante da incidência (Mosely et al. 1997). Estudos imunohistoquímicos sugerem que o CBC ou epiteliomas basocelulares se originem das células tronco do bulge folicular, dos bulbos e células da matriz dos folículos anágenos e de células basalióides específicas da epiderme interfolicular, sendo a neoplasia maligna mais comum entre os humanos (Crowson, 2006).

O CBC apresenta crescimento lento e localmente invasivo (Telfer et al., 2008). Sua malignidade caracteriza-se pelo crescimento contínuo e destrutivo do tumor, sendo as metástases extremamente raras. Apresenta altas taxas de cura com detecção precoce, porém se deixado sem tratamento, a invasão local leva a dano tecidual considerável, com comprometimento da função e estética. A morbidade resulta da invasão tecidual e destruição local, particularmente na face, região cervical e couro cabeludo.

Há discreta prevalência entre os indivíduos do sexo masculino e maior frequência em pacientes a partir da sexta década de vida (Gallagher et al., 1990; Miller et al., 1994; Karagas et al., 1999; Chinem e Miot, 2011; Jurciukonyte, 2013).

O CBC privilegia áreas fotoexpostas do tegumento. Localiza-se em aproximadamente 80% dos casos na face (30% na região nasal) e região cervical, embora já tenha sido descrito, eventualmente, nas regiões genital, areolar, inguinal, interdigital, nas axilas, no umbigo, no couro cabeludo e nas mucosas (Chinem e Miot, 2011).

Em 175 casos de CBC, Betti et al. (2009) observaram os 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 indivíduos mais jovens apresentam maior prevalência de CBC superficiais e lesões no tronco que os idosos ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ respectivamente). Houve também associação entre o subtipo clínico e a 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

A carcinogênese do CBC é série complexa de eventos ainda em investigação. Aparentemente os fatores etiológicos mais significantes são a predisposição genética e a exposição à radiação ultravioleta, tanto exagerada e intermitente quanto a cumulativa (Armstrong e Kricker, 1995; Gailani et al. 1996a). Acredita-se na possibilidade da pele na infância ser mais suscetível ao efeito carcinogênico da radiação ultravioleta (RUV) (Corona et al., 1996). Estudos epidemiológicos sugerem que a exposição solar até os 20 anos de idade, especialmente queimaduras até os 15 anos, iniciam um processo de carcinogênese que será manifestado entre 40 e 60 anos após (Goldberg LH, 1996).

A ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor representam importantes papéis na carcinogênese. O Bcl-2 é oncogene importante que suprime apoptose e encontra-se em altos níveis em pacientes com CBC, sugerindo transformação neoplásica dependente do tempo de sobrevivência aumentado das células, e não de um aumento na proliferação das mesmas (Verhaegh et al. 1995). A disfunção do gene supressor de tumor p53, que leva células lesadas a apoptose e tem sido atribuída à exposição solar crônica, também tem papel importante na gênese do CBC (Wilkonkal et al. 1997).

A radiação ultravioleta (UV) compreende energias com comprimento de onda variando entre 200 a 400nm, sendo considerada o fator de risco mais importante para desenvolvimento do CBC. É subdividida em bandas UVA, UVB e UVC. O espectro UVB, de 290 a 320 nm gera dano direto ao DNA e a seu sistema de reparo, além de alterar o sistema imunológico, resultando em alterações genéticas progressivas e em formação de neoplasias. Mutações no gene supressor de tumor TP53 forma encontradas em cerca de 50% dos casos de CBC. Um período de latência de 20 a 50 anos é típico entre o dano ao DNA causado pela radiação UV e a manifestação clínica do tumor (Situm et al., 2008). Nas últimas décadas, o desejo de bronzamento da população e maiores tempos de exposição solar com uso de bloqueadores contra radiação UVB acabou levando ao aumento do potencial carcinogênico da banda UVA (Laat e de Gruijl, 1996).

Outros fatores reconhecidos como predisponentes ao desenvolvimento do CBC são indivíduos com pele clara e pouca capacidade de se bronzear (fototipos I e II de *Fitzpatrick*), história de câncer de pele na família, idade maior que 50 anos, sexo masculino, portadores da síndrome do nevo basocelular (Gorlin), xeroderma pigmentoso, albinismo, uso de imunossupressores, exposição a radiação ionizante, psoralenos ou carcinógenos como o arsênico. Devem também ser levados em consideração fatores como disfunções do sistema imunológico e lesões cutâneas como nevo sebáceo, cicatrizes, lentigos solares e as queratoses actínicas. Adicionalmente, pacientes que já apresentaram CBC têm risco significativamente maior de desenvolver nova lesão primária (Gorlin R, 1995; Zak-Prelich et al., 2004). Além da síndrome do nevo basocelular, outras síndromes genéticas como a síndrome de Bazex e síndrome de Rombo levam a maior propensão ao desenvolvimento de múltiplos CBC.

As proteínas sinalizadoras da família *Hedgehog* são morfógenas poderosas e mediadoras do desenvolvimento embrionário, da morfogênese dos adultos e carcinogênese, relacionando-se com o surgimento de tumores como o CBC, o meduloblastoma e o rabdomiossarcoma. Recentemente, essa família de proteínas foi relacionada com a angiogênese em diferentes contextos podendo, através desse mecanismo, ser também responsável pela formação de neoplasias (Nagase et al., 2008).

Em 60% dos casos de CBC esporádicos há alteração ou deleção do gene humano homólogo da *Drosophila* (PNCH), localizado no cromossomo 9q22.3 (Greinert, 2009).

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

A ocorrência de tumores consecutivos é frequente, sendo a reincidência mais comum no primeiro ano. O risco de um paciente com CBC apresentar outra lesão em cinco anos chega a 50% e a cada novo tumor, o risco de reincidência aumenta progressivamente. Pacientes com dez ou mais CBC apresentam mais de 90% de chance de uma nova lesão. Sexo masculino, idade acima de 60 anos, localização no tronco, CBC do tipo superficial ao exame histopatológico e presença de múltiplas queratoses actínicas na pele são elementos preditivos para o surgimento de novas lesões (Chinem; Miot, 2011).

1.1.3 Manifestações clínicas

Os CBC podem apresentar tamanhos variados, desde poucos milímetros até vários centímetros de diâmetro. Com o crescimento as características clínicas costumam tornar-se mais evidentes. Algumas características que podem estar presentes e são relativamente frequentes no CBC são bordas peroladas, telangiectasias, ulceração e sangramento recorrente. As lesões podem ser extremamente friáveis em alguns casos. As características clínicas variam de acordo com os diferentes subtipos do tumor. Em alguns casos dor, parestesias e paralisias podem ocorrer e indicar acometimento perineural em tumores primários ou recorrentes. Sintomas neurológicos em áreas previamente operadas podem sugerir acometimento neural (Niazi; Lamberty., 1993; Leibovitch et al., 2005).

1.1.3.1 Carcinoma basocelular nodular (CBCn)

O CBCn é o subtipo mais comum. Acomete principalmente a cabeça e o pescoço e apresenta-se usualmente como pápula ou nódulo infiltrado, translúcido, geralmente com telangiectasias de padrão característico à dermatoscopia (Figura 01). Costuma apresentar crescimento lento e insidioso, podendo evoluir com ulceração e invasão de tecidos subjacentes. Alguns diagnósticos diferenciais importantes são o nevo intradérmico e o melanoma amelanótico (McCormack et al., 1997).

Pode apresentar aumento na melanização. Nestes casos é denominado CBCn pigmentado, sendo importante diagnóstico diferencial do melanoma nodular (K D et al., 2013).

As lesões com ulceração central e borda infiltrada de tonalidade perolada, geralmente com crescimento lento, recebem o nome de úlcera rotunda. Na face, com a evolução, pode haver comprometimento do globo ocular, infiltração da região nasal, ou até mesmo invasão do crânio.

1.1.3.2 Carcinoma basocelular superficial (CBCs)

Os tumores superficiais ocorrem principalmente nos ombros e tronco, podendo ser múltiplos (Plucchi et al., 2007). Caracterizam-se como placas eritematosas, muitas vezes descamativas, bem delimitadas, lembrando lesão eczematizada. Usualmente tem crescimento lento e centrífugo e devem ser diferenciados de doença de Bowen, doença de Paget, psoríase, eczema e dermatofitoses. Muitas vezes são pigmentados (Figura 01) (McCormack et al., 1997; Saldanha et al., 2003).

1.1.3.3 CBC esclerodermiforme ou morfeia-like

É uma variante incomum, de crescimento agressivo, pior prognóstico e grande possibilidade de infiltração e recidiva. Recebe este nome por promover intensa fibrose assemelhando-se a uma lesão de morfeia. Acomete principalmente a face e costuma apresentar-se como placa solitária, amarelada, discretamente atrófica e com limites mal definidos, com ulceração infrequente (Figura 02). Através da palpação é possível, em muitos casos, observar infiltração da derme. Por apresentar poucos sintomas o diagnóstico muitas vezes é tardio levando a grande morbidade cirúrgica (Raasch et al., 2006).

1.1.3.4 Outros tipos clínicos

Muitos autores definem tumores com 5 ou mais centímetros de diâmetro como CBC gigante (Figura 02). Nestes casos há maior agressividade, risco de recorrência e morbimortalidade (Archontaki et al., 2009).

O fibroepitelioma de Pinkus é forma rara de CBC ainda com classificação 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 lesão polipoide. Localiza-se frequentemente na região lombossacral, pubiana ou genitocrural de adultos do sexo masculino, entre a quarta e a sexta décadas de vida. Costuma iniciar-se como pápula ou placa eritematosa podendo tornar-se lesão pedunculada. As lesões podem ser únicas ou múltiplas e o diagnóstico muitas vezes não é aventado clinicamente, sendo revelado pela histopatologia (Su et al., 2006; Pan et al, 2008).

Figura 01 - Aspectos clínicos do CBC

(a) CBC Nodular: pápula perlácea, com telangiectasias na pálpebra inferior direita. (b) Nódulo eritemato-infiltrado com brilho perláceo e telangiectasias no pavilhão auricular à direita. (c) Telangiectasias típicas à dermatoscopia. (d) Nódulo pigmentado no couro cabeludo – CBCn pigmentado. (e) CBC Superficial: Placa eritemato-descamativa, com algumas crostas na região pré-esternal. (f) Placa eritematosa de limites imprecisos com áreas pigmentadas na região pré-tibial à esquerda, típica de CBCs pigmentado.

Figura 02 - Aspecto clínico do CBC excedendo 5cm e CBC esclerodermiforme (a) Placa eritemato-infiltrada, ulcerada, com telangiectasias na região temporal esquerda. (b) Paralisia facial periférica decorrente da infiltração pela neoplasia. (c) CBC esclerodermiforme: placa solitária, amarelada, discretamente atrófica, com aspecto cicatricial e limites imprecisos no mento à esquerda. (d) Infiltração da órbita por CBC.

1.1.4 Diagnóstico e prognóstico

O diagnóstico é usualmente inferido através do exame clínico dermatológico, sendo que o refinamento diagnóstico e aumento da acurácia podem ser obtidos com o uso do dermatoscópio (Lallas et al., 2014). Um estudo demonstrou que a acurácia do diagnóstico clínico é de 70% para dermatologistas experientes, 65% para dermatologistas em início de carreira e 64% entre os residentes da área (Presser et al., 1987).

O exame histopatológico pode e deve ser indicado quando há dúvidas em relação ao diagnóstico clínico ou para definir a modalidade terapêutica, uma vez que o subtipo histológico é um dos fatores relacionados ao prognóstico (Tabela

01). A conduta adequada diminui as chances de destruição tecidual, invasão, recorrências e metástases (Telfer et al., 2008).

Tabela 01 - Fatores que influenciam no 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, infiltrativo e metatípico)
Características histológicas da agressão	Envolvimento perineural
Falha de tratamentos prévios	Lesões recidivadas
Imunossupressão	Possível aumento no risco de recidiva

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

A classificação dos CBC usualmente relaciona-se à sua evolução (Crowson et al., 2006). Os subtipos superficial e nodular são classificados como de baixo risco, com crescimento indolente. O subtipos considerados de alto risco, sendo formas agressivas de CBC, 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 à variante nodular convencional). Cerca de um terço dos tumores apresenta padrões histológicos mistos (Sexton et al., 1990).

As características em comum dos CBC são o predomínio de células basalóides 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 (Figura 03).

Nos tumores infiltrativos há uma tendência de crescimento sem apresentação de paliçada, com pouca ou nenhuma formação de ninhos de células basalóides 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) .

Figura 03 - Aspecto histopatológico do CBC
(a) CBC nodular exibindo células basalóides com formação de núcleos em paliçada na periferia e presença de fenda artefactual entre o epitélio e o estroma (H&E 10x). (b) Padrão histológico misto, com CBC superficial e esclerodermiforme observado durante cirurgia micrográfica de Mohs (Congelação - H&E 10x).

1.1.5.1 CBCn

Caracteriza-se por massas nodulares de células basalóides que se estendem para a derme papilar ou reticular. Pode haver formação de espaços císticos gerados pela necrose tumoral, presença de mucina ou perda da adesão celular. Em alguns casos pode ser observada diferenciação em outros elementos como glândulas écrinas, sebáceas e outras. O componente superficial coexiste em cerca de um terço dos casos de CBCn (Crowson, 2006). A presença de melanina indica o componente pigmentado observado na clínica. Como frequentemente ocorrem em áreas expostas, a elastose solar pode ser proeminente em alguns casos.

1.1.5.2 CBCs

Caracteriza-se pela proliferação de células basalóides atípicas formando um eixo paralelo com a epiderme, com fendas intercelulares preenchidas por material mucinoso, presumidamente produzido pelas células estromais. As células tumorais podem colonizar o folículo piloso e, raramente, estruturas anexiais. As mitoses são infrequentes e células apoptóticas são raras. Ocasionalmente podem ser observados pigmentos de melanina no epitélio e em histiócitos do estroma subjacente. Pode haver infiltrado inflamatório linfocitário em faixa. Costuma recorrer por apresentar múltiplos focos de neoplasia (Sexton et al., 1990; Saldanha et al., 2003).

1.1.5.3 CBC micronodular

Apresenta ninhos tumorais com contornos e formatos semelhantes ao CBCn, no entanto menores, mais dispersos e com distribuição irregular, acometendo muitas vezes a derme profunda e tecido subcutâneo. Os artefatos de retração são incomuns e pode haver proliferação do estroma como nos tumores infiltrativos. É considerado subtipo agressivo por ter chances aumentadas de recorrência (Sexton et al., 1990; Hendrix et al., 1996).

1.1.5.4 CBC esclerodermiforme

Esta variedade representa entre um a cinco por cento dos CBC e é caracterizada por colunas de células basalóides formando angulações agudas, em geral com pouca espessura, uma ou duas células, imersas em estroma densamente colagenizado, com invasão frequente da derme reticular e tecido subcutâneo. Os artefatos de retração são menos comuns neste tipo histológico, mas podem ocorrer. Pode coexistir com outras variantes morfológicas de crescimento agressivo (Takei et al., 1985).

1.1.5.5 Outros subtipos histopatológicos

O CBC infiltrativo apresenta ninhos de células tumorais com tamanhos e formatos irregulares e angulações agudas na sua periferia. Ocasionalmente há artefato de retração, atividade mitótica frequente e necrose individual das células neoplásicas. O estroma frequentemente apresenta fibrose. Tipicamente as cadeias de células tumorais são alongadas e apresentam de cinco a oito células na sua espessura. Aproximadamente um terço dos casos associa-se à forma nodular. Como nos tumores com padrão esclerodermiforme este subtipo tende a ser mal delimitado, pode invadir o subcutâneo, tecido muscular e outras estruturas e possui maior probabilidade de invasão perineural como pode ser observada na figura 04 (Sexton et al., 1990).

Antes conhecido como basoescamoso, o CBC metatípico apresenta-se como tumor intermediário entre o CBC e o carcinoma espinocelular (CEC), tanto na histologia como no comportamento, aumentando-se assim o risco de recorrências e eventuais metástases (Martin et al., 2000; Garcia et al., 2009).

Os CBC podem apresentar variedades de diferenciação celular sem implicações no prognóstico. Alguns exemplos são: 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) e o fibroadenoma de Pinkus.

Figura 04 - Invasão perineural
(a) Defeito cirúrgico final após remoção de CBC metatípico com invasão perineural. (b) Área demonstrando invasão perineural (H&E 10x).

1.1.6 Opções terapêuticas

São diversas as opções terapêuticas para o CBC. Vários fatores devem ser levados em conta na escolha, entre eles tanto os relacionados ao tumor (localização, tamanho, subtipo histológico e história de tratamentos prévios) quanto os relacionados ao paciente (idade, fototipo e estado de saúde). A experiência do dermatologista com um tipo específico de tratamento deve também ser considerada. O resultado cosmético pós-procedimento, cuidados, complicações, custos e taxas de recidiva associados a cada modalidade terapêutica devem ser avaliados individualmente para cada paciente.

O objetivo do tratamento deve ser a completa erradicação do tumor, evitando assim as recidivas e necessidade de intervenções futuras, com máxima preservação funcional e estética. As decisões terapêuticas devem considerar fatores individuais e preferências do paciente. Para isso, o conhecimento da região anatômica e das características histológicas da lesão é de extrema importância.

Para decisão da opção terapêutica a ser utilizada, deve-se levar em consideração fatores que influenciam no prognóstico dos CBC (Tabela 01), além de fatores específicos dos pacientes (estado geral, comorbidades, uso de antiagregantes plaquetários ou anticoagulantes).

Houve desenvolvimento de múltiplas opções terapêuticas tópicas e não cirúrgicas nas últimas décadas, no entanto o tratamento cirúrgico e a radioterapia permanecem como as principais escolhas para as lesões de alto risco (Bath-Hextall et al., 2007). Uma grande distinção entre as modalidades terapêuticas para o CBC é a possibilidade de controle das margens, que ocorre quando excisões cirúrgicas são empregadas. Nas outras modalidades como criocirurgia, radioterapia, curetagem e eletrocoagulação, terapia fotodinâmica e imunoterapia não é possível o controle histológico das margens. É importante ressaltar que os CBC recidivados 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).

A razão da retirada de uma margem de segurança de pele clinicamente normal no tratamento cirúrgico do CBC decorre da suposição da existência de lesão tumoral além das margens clinicamente visíveis. A extensão da lesão subclínica varia com o tipo histológico do tumor, que é fundamental na escolha da terapêutica (Breuninger; Dietz, 1991). Quanto maior a margem de segurança, maior a possibilidade de ressecção completa do tumor e, com exceção da cirurgia micrográfica (modalidade cirúrgica com avaliação completa das margens no intra-operatório), em todas as modalidades terapêuticas, as margens de segurança devem ser consideradas. Wolf e Zitelli (1987), através de informações obtidas por análise das margens na cirurgia micrográfica 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 bem delimitados, margens cirúrgicas de 3,0 mm levariam a 85% de ressecção completa do tumor; quando essa margem foi ampliada para 4,0 a 5,0 mm, a cura seria atingida em 95% dos casos.

Usualmente as modalidades terapêuticas são divididas em não cirúrgicas e cirúrgicas, que são subdivididas em duas categorias: excisional e destrutiva (Kunte; Konz, 2007; Telfer et al., 2008; Skelton, 2009).

1.1.6.1 Cirurgia convencional

A excisão cirúrgica convencional é a técnica mais utilizada para o tratamento do CBC (Bower et al., 2000). Na maioria das vezes o resultado estético é bom, particularmente quando o tumor é excisado e a ferida reparada, no entanto vale ressaltar que antes do reparo do defeito, principalmente se for necessária a confecção de um retalho, a informação histopatológica sobre a erradicação do CBC é extremamente importante. Quando existe dúvida sobre a mesma deve ser considerada a cicatrização por segunda intenção ou a espera do resultado histopatológico antes do fechamento da ferida cirúrgica. Nos casos de margens comprometidas, existem fortes evidências para uma nova intervenção imediata, especialmente quando o defeito foi reparado com enxerto ou retalho (Robinson; Fisher, 2000). A reexcisão por cirurgia micrográfica de Mohs é técnica de escolha, principalmente nos casos de margens profundas comprometidas e com tipos histológicos agressivos (Telfer et al., 2008). Segundo Chiller et al. (2000), o uso da curetagem previamente ao procedimento cirúrgico em CBC primários pode aumentar a chance de cura e a acurácia na definição da margem tumoral real.

Muitos fatores associam-se à falha no tratamento, sendo os principais a extensão subclínica, que leva a ressecções incompletas do tumor, a falta de experiência do cirurgião, a região anatômica, o subtipo histológico e a realização de múltiplas exérese durante um mesmo procedimento. Em relação aos tumores incompletamente removidos, de Silva et al. (1985) encontraram 41% de recorrência em CBC com ressecção incompleta. Sussman e Liggins (1996) descreveram 30% de recorrência para ressecções incompletas, sugerindo um seguimento de pelo menos três anos para acompanhamento de recidivas. Fatores relacionados ao aumento das recidivas são acometimento de ambas as margens da excisão, exérese incompleta após radioterapia e quando há o acometimento de margens profundas. Entre os CBC ressecados incompletamente o intervalo entre os sinais e sintomas de recorrência e a realização da cirurgia de Mohs foi maior em homens, pacientes acima de 65 anos, que apresentavam tumores no nariz ou região malar, nos subtipos agressivos ou fibrosantes e naqueles que receberam enxertia ($p=0,001$). Além disso, a abordagem precoce do CBC removido incompletamente leva a cirurgias menos extensas (Robinson; Fisher, 2000). Apesar de existir um grande número de estudos mostrando a efetividade das várias modalidades

terapêuticas para o CBC num curto prazo de tempo, somente alguns foram realizados com seguimento de pelo menos 5 anos. Mais raros ainda são os estudos com tempo de seguimento adequado, prospectivos e randomizados (Silverman et al., 1992; Thissen et.al., 1999). Com seguimento inferior a 5 anos a taxa de recorrência certamente é subestimada. Estudo demonstrou que a taxa de recorrência em 5 anos é duas vezes maior que a estimada em 2 anos de seguimento (Rowe et al., 1989).

1.1.6.2 Cirurgia micrográfica de Mohs (CMM)

A cirurgia micrográfica é atualmente o padrão ouro para o tratamento de grande parte dos tumores cutâneos incluindo o CBC, tendo as mais altas taxas de cura e conservando ao máximo o tecido sadio. Caracteriza-se pela excisão seriada de tumores associada ao mapeamento do campo operatório e análise histopatológica. É um método preciso para remoção de tumores cutâneos com avaliação de aproximadamente 100% das margens ressecadas (Lawrence, 1999).

A CMM foi descrita pelo Dr Frederic E. Mohs em 1941. A técnica original, denominada quimiocirurgia, baseava-se no princípio da fixação do tecido com aplicação de cloreto de zinco sobre o tumor ainda no paciente. Após a fixação o tumor era ressecado e submetido a cortes tangenciais, incluindo num mesmo plano tanto a epiderme quanto a profundidade do tecido. Dessa forma, com cortes “horizontais”, havia possibilidade de uma avaliação de toda a periferia da área ressecada, permitindo assim a análise de 100% das margens por microscopia óptica. As desvantagens da quimiocirurgia com fixação in-vivo eram dor intensa e somente uma fixação seguida de um corte no mesmo dia. A eventual ressecção de área ainda acometida não poderia ser realizada imediatamente, sendo necessários dias para completar uma cirurgia com várias fases. A técnica foi refinada, permitindo ressecção sob anestesia local sem necessidade de fixação in-vivo. O tecido ressecado é submetido a congelamento e posteriormente a cortes “horizontais”. Com as mudanças a técnica foi denominada cirurgia micrográfica - Controle microscópico da excisão do tumor associado ao registro gráfico indicando a posição de eventual tumor remanescente (Shriner et al., 1998).

Ao contrário de outras modalidades terapêuticas para tratamento do CBC, entre elas curetagem e eletrocoagulação, laser, criocirurgia, radioterapia, terapia por drogas tópicas ou intra-lesionais, que são modalidades destrutivas, assim como na excisão cirúrgica convencional, a cirurgia micrográfica de Mohs permite verificação histopatológica das margens.

A excisão convencional da lesão com margens usualmente entre 3 e 6 milímetros além do tumor visível é utilizada para a maioria dos tumores cutâneos (Berezovsky et al., 2008). Esta técnica é normalmente seguida de uma avaliação histopatológica limitada das margens (Rapini, 1990). Em contraste, a cirurgia micrográfica de Mohs tem como objetivo a avaliação de 100% das margens da lesão ressecada. Embora as modalidades de tratamento convencionais resultem em uma alta taxa de cura para tumores malignos cutâneos não-melanoma pequenos e bem delimitados, taxas maiores de cura tanto para tumores primários como para recorrentes são alcançadas com a cirurgia micrográfica de Mohs (Rowe et al., 1989).

Embora o conceito da cirurgia micrográfica de Mohs seja simples, a técnica torna-se complexa por envolver uma série de suboperações. Sua efetividade depende de cada passo que constitui o procedimento, ou seja, o exame físico pré-operatório, a excisão da lesão, o mapeamento tanto do tecido removido quanto da área submetida à ressecção, o processamento histológico, a leitura no microscópio e a reparação da área ressecada.

O procedimento começa com o exame físico e marcação acurada das margens. É realizado um desenho preciso do tumor em um mapa, garantindo assim posicionamento correto durante a cirurgia. Após a anestesia, a lesão pode ser submetida a um debulking com lâmina ou cureta. A curetagem pode auxiliar na delimitação de possíveis focos subclínicos do tumor (Glen et al., 2005; Jih et al., 2005).

Classicamente a área a ser removida é excisada a um ângulo de 45 graus em relação à superfície cutânea com pequena margem além da lesão demarcada ou área do debulking. Isto permite o corte em linha reta da epiderme, derme e profundidade da lesão no criostato, permitindo um exame em um único plano (Cottel et al. 1988). No entanto, este método não permite exame adequado da epiderme em todos os casos. Algumas vezes, para uma melhor avaliação, a incisão periférica é realizada perpendicular à superfície cutânea. Nestes casos os

exames da periferia e profundidade são realizados separadamente, sendo a profundidade avaliada por secções horizontais das lesões (Rapini, 1990b; Rapini, 1992; Asadi et al., 2004).

O tecido removido é cortado em pequenos fragmentos que são marcados com tinta para tecido, garantindo assim uma orientação correta. Subsequentemente os fragmentos são congelados no criostato e ao mesmo tempo as superfícies ressecadas são cuidadosamente posicionadas para permitir avaliação de todas as margens ressecadas em um mesmo plano, tanto as laterais quanto a profunda. Isto garante avaliação de aproximadamente 100% das margens ressecadas em contraste com aproximadamente 0,1% no exame histológico tradicional (Otley; Salasche. 2004).

As lâminas na maioria das vezes são coradas com hematoxilina e eosina (H&E). O azul de toluidina pode ser utilizado e é particularmente útil por ressaltar as ilhas do carcinoma basocelular corando os mucopolissacarídeos que as envolvem metacromaticamente em rosa forte.(Humphreys et al., 1996)

Os cortes para avaliação da epiderme e derme são usualmente realizados com espessura entre 5 e 6 µm; para a gordura entre 15 e 25 µm.(Snow; Madjar, 2001; Silapunt et al., 2004). Cortes muito espessos dificultam a avaliação e podem levar a interpretações incorretas. Os cortes seriados permitem a diferenciação das estruturas anexiais dos ninhos tumorais. Sendo assim, embora exijam maior tempo para processamento e leitura, diminuem o número de interpretações incorretas.

Novas ressecções serão eventualmente realizadas após a avaliação histológica até que todas as margens se mostrem livres de tumor. Após remoção total do tumor, o reparo do defeito será realizado com a técnica mais favorável seja por fechamento primário, enxertos, retalhos ou até mesmo por segunda intenção. (Rapini, 1992; Silapunt et al., 2004).

A avaliação de aproximadamente 100% das margens ressecadas e o mapeamento preciso fazem com que a CMM ofereça altas taxas de cura com máxima preservação de tecido saudável. Sendo assim, tem grande valor para o tratamento de tumores com alto risco de recorrência e de tumores em áreas com necessidade de poupar tecido, impedindo assim um dano funcional ou estético além do necessário.

As indicações para a CMM estão bem estabelecidas especialmente para tumores de pele não-melanoma. Seu papel no tratamento dos melanomas e carcinoma de Merkel ainda é controverso. A maioria dos pacientes recebem a indicação após biópsia da lesão confirmar a presença de carcinoma.

A CMM é indicada quando o CBC apresenta alto risco de recorrência. Qualquer característica de alto risco isoladamente inclui o tumor nesta categoria. Na tabela 02 podem ser observadas as características.

Tabela 02 - Fatores que classificam o CBC como de alto risco

Adaptado de National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: basal cell skin cancers. Version 1.2015. Acesso online em 01 de agosto, 2015, at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc.pdf

Característica	Baixo risco	Alto risco
Dimensão / Localização	Área L < 20mm Área M < 10mm Área H < 06mm ¹	Área L ≥ 20mm Área M ≥ 10mm Área H ≥ 06mm ¹
Delimitação	Bem delimitado	Mal delimitado
Primário / Recidivado	Primário	Recidivado
Imunossupressão	(-)	(+)
Em área irradiada	(-)	(+)
Subtipo histológico	Baixo risco ²	Alto risco ³
Envolvimento perineural	(-)	(+)

Área H = “Máscara da face” (Área central da face, pálpebras, sobrancelhas e região periorbital, região nasal, dos lábios, mentoniana, sulcos pré e pós auriculares, auricular e temporal), além da região genital, mãos e pés.

Área M = Regiões malar, frontal, couro cabeludo, cervical e pré-tibial

Área L = Tronco e extremidades (excluindo região pré-tibial, mãos, pés e tornozelos)

¹A localização pode classificar o CBC como de alto risco independentemente do tamanho em certas situações.

²Os subtipos histológicos de baixo risco incluem o CBC superficial, nodular e alguns outros padrões com crescimento pouco agressivo como o ceratótico, infundibulocístico e o fibroepitelioma de Pinkus.

³Os componentes esclerodermiforme, infiltrativo, micronodular ou metatípico em qualquer porção do tumor classificam o CBC como de alto risco.

Em relação à taxas de recorrência em 5 anos, estudo prospectivo randomizado mostrou em 5 anos de seguimento taxa de recorrência de 3,8% em 200 pacientes com CBC de alto risco. Sendo de 1,7% para tumores primários e de 4,8% para recidivados (Julian; Bowers, 1997). Outro estudo prospectivo demonstrou taxa de cura de 97,1% em série de 929 CBC da orelha externa (Mohs et al., 1988). Em uma grande série de 1414 CBC nas pálpebras, houve taxa de cura em 5 anos de 99,4% para tumores primários e de 92,4% para tumores recorrentes (Mohs, 1986).

Os maiores entraves para realização da CMM, que muitas vezes até mesmo contra-indicam o procedimento, são tumores não contínuos ou não adequadamente identificáveis por congelação. A impossibilidade técnica para controle histológico de todas as margens também pode comprometer o procedimento (tumores profundos no canto medial dos olhos são bons exemplos de dificuldade técnica pois dificilmente são removidos sem fragmentação).

Havendo invasão óssea a técnica deve ser modificada e combinada a outros procedimentos para ganhar efetividade.

Lesões muito grandes podem inviabilizar a técnica pelo número de fragmentos e tempo necessário para análise, levando à necessidade de técnicas associadas ou cirurgia em estágios.

Idade e comorbidades podem, em alguns casos, inviabilizar a cirurgia.

Quanto às desvantagens em relação às outras modalidades terapêuticas, consome consideravelmente mais tempo e trabalho. Quando comparada à crioterapia ou curetagem e eletrocoagulação adiciona a necessidade de laboratório ao tratamento. O número de cirurgiões que dominam a técnica ainda é pequeno e o custo, muito alto.

1.1.6.3 Curetagem e eletrocoagulação

Consiste em curetagem do tumor em toda sua extensão friável, seguida por eletrocoagulação do leito. Não há protocolos bem estabelecidos em relação ao tipo exato de cureta ou número de ciclos utilizados para o tratamento. O método é efetivo para lesões de baixo risco, com altas taxas de cura quando bem indicado. Revisões mostram que para tumores até 1,0 cm, a taxa de cura é de 98,8%; para

CBC de 1,0 a 2,0 cm, é de 95,5%. 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). Silverman e colaboradores (1991) demonstraram baixas taxas de recorrência em 5 anos (3,3%) para CBC tratados por curetagem e eletrocoagulação em áreas de baixo risco incluindo tumores primários de todos os tamanhos. As taxas de recorrência aumentaram progressivamente em áreas de risco intermediário ou alto, que se beneficiariam desta modalidade somente com lesões abaixo de 6mm de diâmetro (de baixo risco).

A curetagem e eletrocoagulação pode ser combinada com várias modalidades terapêuticas tópicas como o imiquimode (Wu et al., 2006), terapia fotodinâmica (Soler et al., 2001) e até mesmo a criocirurgia (Nordin et al., 2002), a fim de melhorar a capacidade de delimitação do tumor e aumentar possibilidade de destruição completa do mesmo.

1.1.6.4 Criocirurgia

A criocirurgia é uma modalidade terapêutica destrutiva, que consiste na aplicação de nitrogênio líquido que possui temperatura de -196°C sobre a lesão a ser tratada. Isto leva a um resfriamento da pele com temperatura entre -50 a -60°C mesmo a 5mm de profundidade, 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). Usualmente são empregados dois ciclos de congelamento e descongelamento, sendo este de um minuto para destruição efetiva do tumor. Dois ciclos parecem ter maior importância quando a lesão localiza-se na face (Mallon; Dawber, 1996). Grande desvantagem deste método, por ser destrutivo, é a impossibilidade do exame histopatológico da lesão tratada.

1.1.6.5 Terapia tópica (Imiquimode, 5-Fluorouracil, Mebutato de ingenol e Terapia fotodinâmica)

O imiquimode é imunorregulador agonista dos receptores *toll-like* 7, expressos em células dendríticas e monócitos. Leva à indução de produção de citocinas como o interferon (IFN), o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL) 12, ativando assim a imunidade T auxiliar (T *helper*, Th) 1 (Stockfleth et al., 2003).

Vários estudos demonstram eficácia do creme de imiquimode a 5% no tratamento do CBCs, no entanto as melhores respostas ao tratamento com taxas de cura clínica e histológica foram de 75%. As taxas de cura associaram-se ao uso frequente e prolongado (5x/semana) e à intensidade da reação inflamatória local (Geisse et al., 2004). Idealmente deve ser utilizado por no mínimo 6 semanas (Schulze et al., 2005).

Em relação ao mecanismo de ação do imiquimode, estudos indicam 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 imiquimode 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-Fluorouracil (5-FU) é agente quimioterápico que pode ser aplicado para tratamento de ceratoses actínicas ou CBCs em creme a 5%. É usualmente utilizado 2 vezes ao dia por três a doze semanas. Ulceração da área tratada deve ser esperada. É uma pirimidina análoga cujos metabólitos citotóxicos incorporam ao DNA e RNA, induzindo apoptose. As taxas de cura no tratamento do CBCs variam de 56% a 75% (Bahner; Bordeaux, 2013). Arits et al. (2013) demonstraram eficácia semelhante ao imiquimode e superioridade em relação à terapia fotodinâmica para tratamento do CBCs.

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).

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.

O creme é aplicado sobre a área a ser tratada e coberto por três horas. A protoporfirina, estimulada pela radiação emitida pela lâmpada, leva à formação de espécies reativas de oxigênio e consequentemente citotoxicidade. A dor durante a aplicação da fase luminosa é significativa para alguns pacientes, com sensações variáveis, desde um simples desconforto à sensação intensa 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). Apesar de alguns estudos controlados demonstrarem remissão importante dos CBCs com esta modalidade terapêutica, outros não demonstram superioridade às outras formas de tratamentos tópicos (Szeimies et.al., 2008; Arits et al., 2013).

1.1.6.6 Vismodegibe

O Vismodegibe, inibidor oral da via enzimática Hedgehog, é o primeiro tratamento sistêmico aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para CBC metastático ou localmente invasivo sem possibilidade de remoção cirúrgica ou radioterapia (Cirrone; Harris, 2012). A taxa de efeitos adversos é muito alta, chegando a 98% dos pacientes em estudos multicêntricos, sendo que o tratamento deve ser reservado para pacientes sem outras possibilidades terapêuticas (Basset-Seguin et al., 2015).

1.1.6.7 Radioterapia

Apesar do tratamento cirúrgico ser o carro chefe para a maior parte dos CBC, a radioterapia é modalidade efetiva para CBC primários, recorrentes após cirurgia ou como terapia adjuvante para CBC de alto risco, principalmente em pacientes com restritas condições cirúrgicas (Telfer et al., 2008). Existem diferentes tipos de aparelhos que promovem o tratamento, como radioterapia superficial (170kV), eletroterapia (gerada por altas energias) e a braquiterapia, 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 durante o procedimento e a possibilidade de evitar procedimentos invasivos em pacientes sem condições clínicas. Como grandes desvantagens destacam-se 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). Idealmente deve ser reservada a pacientes com 60 anos ou mais pelas sequelas a longo prazo (Neville et al., 2007).

A radioterapia pode ser considerada como tratamento adjuvante quando permanecem margens positivas após cirurgia micrográfica de Mohs ou quando há invasão perineural extensa ou de grandes nervos (Mendenhall et al., 2012).

Um algoritmo adaptado para tratamento do CBC pode ser observado na figura 05.

Seguimento clínico - todos os pacientes

Figura 05 - Algoritmo para tratamento do CBC

Adaptado de National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: basal cell skin cancers. Version 1.2015. Acesso online em 01 de agosto, 2015, http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc.pdf

1.2 Fatores de risco no carcinoma basocelular

O CBC forma-se a partir de componente multifatorial, com interação genética e ambiental. Diversos genes e proteínas já foram implicadas na sua carcinogênese, assim como a epidemiologia e os fatores socioambientais foram comprovadamente associados a este tumor. Diversos biomarcadores foram desenvolvidos para a pesquisa de potenciais genes e proteínas que contribuíssem para o surgimento e desenvolvimento do CBC. Pode-se dividir os fatores de risco em fatores preditores de incidência, de múltiplas neoplasias e de recorrência (Kyrgidis et al., 2010).

1.2.1. Preditores de incidência do carcinoma basocelular

Os fatores preditores de incidência do CBC são multifatoriais. Dentre os genéticos, encontramos o polimorfismo ou mutação de diversos genes, como a Melanocortina 1 (MC1R – 16q24.3), uma proteína – G receptora que após exposição solar e associação com o hormônio estimulador de melanócitos (alfa-MSH) estimula a produção de melanina. Este mesmo gene é associado ao fenótipo de ruivos e baixos fototipos, sendo também responsável pela resposta pobre ao bronzeamento após exposição solar. Mutações neste gene são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de neoplasias de pele não-melanoma, podendo aumentar em até 3,3 vezes o risco (Brudnik et al., 2009).

Outra proteína implicada na carcinogênese do CBC é a proteína sinalizadora agouti (ASIP - 20q11.2), que impede o MC1R de se ligar ao alfa-MSH, levando ao fenótipo ruivo com baixo fototipo e potencial maior (até 1,33 vezes) de neoplasias de pele; assim como a enzima tirosinase (TYR R402Q – 11q14-q21), também envolvida na produção de melanina, contribuindo com características pigmentares, além de colaborar para a sensibilidade ao sol. Mutações podem aumentar em até 14% a chance de carcinogênese na pele (Gudbjartsson et al., 2008).

O próprio p53, já discutido previamente, é fator crucial no desenvolvimento do CBC, embora já tenha sido demonstrado que sua mutação possa ocorrer tardiamente neste tumor de pele, sendo fator associado e não desencadeante (Han et al., 2006).

1.2.2 Preditores do desenvolvimento de múltiplos carcinomas basocelulares

É comum a ocorrência de múltiplos CBC em um mesmo paciente. Em alguns pacientes as áreas fotoexpostas estão tão agredidas que são chamadas de campos de cancerização, local onde podem surgir diversas neoplasias associadas. Investigou-se também quais fatores estariam associados ao desenvolvimento de

diversas neoplasias e, um fator coincidente com o risco de incidência de CBC foi ser do sexo masculino (Schinstine et al., 2001).

Estudos genéticos associaram a multiplicidade de CBC com polimorfismo nos genes implicados na produção de TNF-alfa 1, 2, 4, 6, 7 e 10, além do gene da Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) (Hajeer et al., 2000; Ramachandran et al., 2000).

Pacientes com um CBC prévio, tem chance de 27% de desenvolvimento de múltiplos CBC, enquanto que aqueles que tiveram 10 CBC prévios, essa probabilidade sobre para 90% (Bath-Hextall et al., 2007; Allen et al., 2007).

1.2.3 Preditores de recorrência do carcinoma basocelular

Em relação à recorrência dos CBC, há menos estudos e constatações. No âmbito genético, sabe-se que a aneuploidia é mais presente nos paciente com CBC recorrentes, sendo que em 78% dos tumores recorrentes há aneuploidia, contra apenas 32% do grupo controle, sem recorrência, com $p < 0,005$ (Janisson-Dargaud et al., 2008).

Na tentativa de melhorar a detecção dos tumores recorrentes, aplicou-se biomarcadores na comparação com os CBC não-recorrentes. A média de tempo da recorrência foi de 3,3 anos e os marcadores Ki67 e CD31 mostraram-se importantes detectores de recorrência neste tipo de neoplasia de pele. Ki67 é um promotor do ciclo celular, uma proteína não-histona associada aos ribossomos, que age durante todo o ciclo celular, menos em G0, contribuindo para a proliferação celular. O CD31, também chamado de molécula de adesão celular endotelial de plaquetas (PECAM-1), está presente no cromossomo 17, realiza papel importante na remoção de neutrófilos antigos da circulação. Está implicado em diversas neoplasias, como tumores vasculares, hemangio-endoteliomas, sarcomas e carcinomas, dentre eles o CBC. O Ki67 e o CD31 mostraram-se presentes de maneira significativa ($p < 0,001$) nos tumores recidivados, em relação aos tumores primários (Yerebakan et al., 2003)

Por fim, estudos observacionais mostraram que a recidiva de um tumor primário seria de 3,3% em 5 anos, enquanto a recorrência de tumores recidivados seria de 7,3% (aumento de 112% no risco de aparecimento de novo tumor). Interessante que foi demonstrada maior prevalência de recidiva em pacientes mais idosos e que o uso de imunossupressores e a presença de ulceração não influenciaram no índice de recorrência (Van Iersel et al., 2005).

1.3 Marcadores biológicos do carcinoma basocelular

O CBC engloba diversos subtipos de neoplasias com comportamentos biológicos distintos. Atualmente tem-se tentado analisar estes tumores de maneira histológica e imuno-histoquímica para comparar com comportamentos clinicamente mais ou menos agressivos. Há inclusive outro tipo de neoplasia de células basais com diferenciação folicular, o tricoepitelioma, que se assemelha muito, histologicamente, ao CBC, porém, apresenta comportamento biológico benigno.

Comparou-se ambas neoplasias, do ponto de vista de biomarcadores, mostrando diferenciação para marcação com Ki67 e PCNA. Ambos são promotores do ciclo celular, estão muito presentes em neoplasias de pele, porém mostram-se também aumentados em outras doenças proliferativas como dermatite atópica grave, psoríase e verruga vulgar. O PCNA é uma proteína nuclear de 36 kDa que age como cofator da DNA polimerase, sendo essencial para a síntese de DNA. Na mesma ocasião, foram comparados os biomarcadores p53 e Bcl-2, que não mostraram diferença entre Carcinoma Basocelular e Tricoepitelioma, o que poderia sugerir a origem da diferença de comportamento biológicos entre esses tumores (Abdelsayed et al., 2001).

Dentre os marcadores mais utilizados para CBC e que nos chamaram a atenção para trabalharmos, escolhemos o Ber-EP4, cuja especificidade para CBC permite grande distinção de outros tumores epiteliais, como CEC, por exemplo; MNF116, marcador de conjunto de citoqueratinas presente em vários tumores epiteliais; E-Caderina, uma proteína transmembrana de adesão celular, cuja perda está associada a agressividade tumoral e o VEGF, um fator de proliferação vascular

que contribui para o crescimento tumoral e é alvo de terapias biológicas em alguns tipos de neoplasias, visando cessar o suprimento vascular dos tumores. Vejamos com mais detalhes estes marcadores.

1.3.1 Antígeno epitelial (Clone Ber-EP4)

Ber-EP4 é um anticorpo dirigido contra glicoproteínas da membrana celular de peso 34 e 39-kD de células epiteliais humanas, cuja função permanece desconhecida. Apresenta imuno-reatividade para uma grande variedade de estruturas, desde a pele normal até diversos tipos de carcinomas (Krahl et al., 2007).

Algumas das neoplasias que marcam este anticorpo são: carcinomas de mama, esôfago, estômago, rim, pâncreas, fígado, ovário. Nestes órgãos, os carcinomas espinocelulares são corados na camada mais externa pelo Ber-EP4, o que não ocorre no carcinoma espinocelular de pele, assim como não cora os ceratinócitos de epiderme normal, apesar de corar glândulas sudoríparas, sebáceas e folículo piloso, que servem como controle positivo interno da imuno-histoquímica (Jimenez et al., 1995).

A comparação entre marcação do CBC e do carcinoma espinocelular (CEC), mostrou importante imuno-reatividade para o primeiro e nenhuma ou pouca marcação para o segundo, sendo uma ferramenta de diferenciação em tumores de colisão ou de subtipos de difícil diferenciação entre CBC e CEC. (Tellechea et al., 1993). Casos de CBC metatípico (ou também chamado de basoescamoso), coram bem com o Ber-EP4, mas é comum que as áreas metaplásicas e ceratósicas percam a reatividade a este anticorpo. De forma análoga, o CEC basaloide, neoplasia espinocelular descrita em trato aerodigestivo, além da pele, também cora Ber-EP4 na periferia de suas células com diferenciação basaloide. A grande vantagem e necessidade de realizar essa diferenciação é justamente o prognóstico que estes diagnósticos trazem ao paciente, além de abordagens terapêuticas distintas.

Outra diferenciação comumente utilizada é a diferenciação entre CBC e tricoepitelioma, em especial o desmoplásico, o que contribui para decisão terapêutica na resolução destes tumores (Dasgeb et al., 2013). Também o

sebaceoma, presente na Síndrome de Muir Torre, pode levar a dificuldade na diferenciação com CBC, sendo o Ber-EP4 de grande utilidade na diferenciação (Fan et al., 2007).

Apesar de específico para CBC, o Ber-EP4 não mostra em outros carcinomas marcação diferencial com a gradação ou diferenciação tumoral, sendo geralmente forte reator e homogêneo em todos os carcinomas (Moldenhauer et al., 1987).

Raros casos apresentaram marcação negativa de Ber-EP4 em CBC. Mleczo e colaboradores (2011) publicaram um caso de CBC em região palmar, com marcação positiva para MNF (citoqueratinas), mas negativa para Ber-EP4. Discute-se a origem do CBC nestes casos, já que classicamente acredita-se na origem do bulbo folicular, portanto esse tumor apresentar-se-ia apenas em áreas pilosas. No entanto, Youssef et al. (2010), demonstraram em modelo animal que há formação de CBC em células pluri-potenciais da região interfolicular, o que explicaria a neoplasia basaloide na região não pilosa.

1.3.2 Citoqueratina humana (Clone MNF116)

As citoqueratinas (CQ) são importantes marcadores epiteliais, porém seus principais anticorpos de marcação imuno-histoquímicos, como AE1:AE3 e CAM 5.2, apresentam diminuição da antigenicidade pela fixação em formalina, resultando em baixa imuno-reatividade destes marcadores. De maneira oposta, o MNF116, que detecta as CQ 5, 6, 8, 17 e 19, mostra-se como excelente marcador mesmo em amostras parafinadas fixadas com formalina.

O padrão de marcação do MNF116 na pele normal configura imuno-reatividade na camada basal da epiderme, bainha externa de folículo piloso e glândulas sebáceas e sudoríparas, servindo como controles internos positivos.

Os trabalhos de investigação da expressão em neoplasias e lesões pré-neoplásicas com diferenciação epitelial deste marcador mostrou um interessante padrão forte e homogêneo de imunoprecipitação nas células tumorais de CBC, CEC e tumores anexiais, por exemplo. Mas esse padrão de marcação mostrou-se menos intenso em lesões epiteliais pré-neoplásicas como as ceratoses actínicas .

Outro fator útil nas investigações do uso do MNF116 foi a capacidade de diferenciação entre tumores carcinomatosos dos sarcomas e linfomas. Um dado tumor com forte marcação destas CQ praticamente corrobora o diagnóstico de carcinoma em detrimento dos outros (Prieto et al., 1996).

A diferenciação entre CBC e CEC para este marcador, em geral, não é possível pela forte marcação de ambos tumores. Dessa forma, tumores basoescamosos ou CEC basalóides não serão distinguidos pela marcação de MNF116 (Boyd et al., 2011). O CBC é sempre positivo para as CQ 5, 14, 15, 17 e 19. Pode ou não ser positivo para as CQ 1, 6, 8, 10, 16, 18 e 20. Já o CEC é positivo a todas as CQ, podendo ser utilizada a nomenclatura de pan-citoqueratinas positivas (Kurokawa et al., 2011).

1.3.3 Proteína transmembrana de adesão cálcio-dependente de epitélio (E-Caderina)

As Caderinas são glicoproteínas transmembrana de adesão celular Ca^{2+} dependentes. Podem ser Epitelial, Neural ou Placentária, sendo que a E-Caderina (E-CD) é expressa em praticamente todos tecidos epiteliais, sendo presente nas laterais e ápice dos ceratinócitos basais e ao redor de todo o ceratinócito da camada espinhosa, como as desmogleínas (Takeichi et al., 1991).

Tem papel importante na morfogênese e embriogênese epitelial e sua expressão está reduzida durante a progressão da carcinogênese em modelos animais e em diversos carcinomas humanos, como os carcinomas de mama (Frixen et al., 1991). Sugere-se que esta molécula assuma um papel de supressão de invasão, sendo que a perda da expressão da E-CD tornaria o tumor mais agressivo e invasivo (Magee et al., 1991).

Estudos em neoplasias de mama mostram uma interessante relação da expressão das caderinas com os tipos tumorais e sua manifestação clínica. Para o carcinoma de mama lobular, a perda de marcação da E-CD está associada a tumores mais invasivos. Já para os carcinomas de mama ductais esta relação ainda não foi bem estabelecida (Rasbridge et al., 1993).

Os estudos de Caderinas em CBC mostram que a expressão de E-Caderina pode ser menor em tumores histologicamente agressivos, como os esclerodermiformes e infiltrativos. Apesar desta neoplasia não ser classicamente associada a metástases, sabe-se que tumores agressivos são altamente infiltrativos e recorrentes, podendo gerar grande dano estético e funcional nos pacientes.

Pizarro e colaboradores (1994) demonstraram marcação forte e homogênea em CBC nodulares e superficiais e marcação fraca ou heterogênea em CBC infiltrativos. Dessa forma, assim como em outros tipos de carcinomas onde a perda de E-CD resulta em maior agressividade tumoral, a perda de expressão deste marcador é um dos fatores biológicos associados a maior infiltração e potenciais falhas de tratamento no CBC.

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

1.3.4 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).

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 mm² 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 diferente 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 CBC sejam responsáveis pela produção de VEGF e outras citocinas e, com isso, regulem a estimulação angiogênica tumoral (Aoki et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Entre os subtipos clínicos e histopatológicos do CBC, neoplasia cutânea mais comum entre os caucasianos, há aqueles considerados de alto risco e os de baixo risco, no que se refere à agressividade e capacidade de recidiva. A cirurgia micrográfica de Mohs (CMM) é técnica que exige treinamento e demanda tempo para sua realização e, a despeito da segurança demonstrada, as taxas de recorrência encontram-se entre 1 e 5% dos casos. Áreas com denso infiltrado inflamatório podem dificultar a avaliação das margens ou da invasão perineural e resultar no aumento de recidivas ou ressecção desnecessária de tecido saudável.

O uso da imuno-histoquímica (IHQ) pode ser de auxílio em alguns casos.

Considerando-se que a cirurgia micrográfica de Mohs é o método proposto para proporcionar as mais elevadas taxas de cura para tratamento do carcinoma basocelular, o presente estudo busca analisar as características dos indivíduos e dos diferentes tipos clínico-histológicos dos CBC tratados pela CMM, com adicional emprego da imuno-histoquímica.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o perfil de indivíduos e de carcinomas basocelulares com indicação de CMM;
- b) Avaliar as relações entre as características do tumor, tipo histológico, tamanho, condição (primário/recidivado) e o número de fases cirúrgicas de CBC excisados por CMM;
- c) Analisar por meio da IHQ, amostra das diferentes variantes clínico-histopatológicas de CBC excisados por CMM;
- d) Comparar a imunomarcagem dos anticorpos Ber-EP4, MNF-116, E-Caderina e VGEF nas diferentes variantes clínico- histopatológicas de CBC excisados por CMM;

- e) Analisar a frequência de positividade, o padrão da imunomarcacão e a disposicão dos focos de células tumorais pela IHQ nos diferentes subtipos de CBC excisados por CMM;
- f) Comparar método convencional de coloracão (H&E) e IHQ em fragmentos positivos e negativos para células do CBC excisado por CMM;
- g) Analisar os fatores associados à extensão subclínica dos tumores.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

Os participantes do estudo foram convidados a participar 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 16819/2012 (ANEXO A).

Os critérios de inclusão foram idade superior a 18 anos, diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma basocelular, indicação de tratamento por cirurgia micrográfica de Mohs (CMM) e a concordância com a participação no estudo que consistia na obtenção de fragmentos do tumor durante o ato cirúrgico.

3.2 Amostragem e casuística do estudo

Após a seleção de indivíduos com o diagnóstico de CBC, esclarecimentos e aceitação de participação no estudo, foram analisados 101 tumores com indicação de CMM retirados de pacientes adultos atendidos no Ambulatório de Tumores Cutâneos do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (HCFMRP-USP).

A intervenção cirúrgica para remoção do tumor cutâneo seguiu técnicas padronizadas de assepsia, anestesia local e aquelas para a cirurgia micrográfica, propriamente dita.

Foi inicialmente realizada análise dos dados demográficos dos indivíduos (sexo, idade), das características do tumor (localização, dimensão, tipo histológico predominante, condição de primário ou recorrente) e do procedimento cirúrgico (número de fases e tipo de reconstrução) e as suas relações.

Posteriormente, foram selecionados 11 blocos parafinados da neoplasia ressecada para análise imuno-histoquímica (IHQ), sendo 8 casos do subtipo histológico esclerodermiforme e 3 casos do subtipo micronodular. Neste grupo, foram analisados fragmentos da neoplasia removida, sendo utilizados fragmentos do “debulking” e da última fase cirúrgica. Nos cortes preparados para a IHQ, foram empregados os anticorpos anti-Ber-EP4, anti-MNF116, anti-E-Caderina e anti-VEGF previamente padronizados.

Seguida à preparação das lâminas, foram capturadas imagens de cada tumor na coloração Hematoxilina & Eosina e com o uso dos marcadores Ber-EP4, MNF116, E-Caderina e VEGF na reação IHQ.

3.3 Cirurgia micrográfica de Mohs (CMM)

3.3.1 Princípios do método

A cirurgia micrográfica é atualmente o padrão ouro para o tratamento do CBC, tendo as mais altas taxas de cura e conservando ao máximo o tecido sadio. Caracteriza-se pela excisão seriada de tumores associada ao mapeamento do campo operatório e análise histopatológica. É um método preciso para remoção de tumores cutâneos com avaliação de aproximadamente 100% das margens ressecadas (Lawrence, 1999).

3.3.2 Execução do método

Os pacientes selecionados foram previamente informados sobre todos os passos do procedimento.

Em todos os casos a remoção dos tumores foi realizada em decúbito dorsal horizontal.

Os CBC foram avaliados clinicamente e a marcação inicial da neoplasia foi realizada com auxílio da dermatoscopia (Figura 06) com o propósito de aumentar a acurácia da delimitação da neoplasia, diminuindo assim o número de fases necessárias para sua completa remoção (Caresana; Giardini, 2010).

Nos casos de tumores recidivados ou incompletamente removidos toda a neoplasia visível e/ou cicatriz cirúrgica foram delimitados e incluídos na marcação inicial com caneta cirúrgica para uso na pele (Figura 07).

Figura 06 - Dermatoscopia para delimitação prévia do CBC submetido à CMM
 (a) Telangiectasias arboriformes típicas na dermatoscopia de CBC da asa nasal. (b) Estruturas em folha na periferia de CBC pigmentado no tronco. (c) CBC de pálpebra inferior. (d) Telangiectasias observadas na dermatoscopia auxiliam na delimitação da lesão.

Figura 07 - Demarcação da área cicatricial a ser removida por CMM
 (a) Cicatriz cirúrgica de CBC recidivado sobre o dorso nasal. (b) Demarcação da lesão e toda a cicatriz adjacente para remoção na primeira fase cirúrgica.

A assepsia foi realizada com solução aquosa de clorexidina a 1% ou solução alcoólica de clorexidina a 5% dependendo da localização do tumor.

Foi realizada anestesia local para todos os casos, e para tal utilizada solução anestésica contendo lidocaína a 2% (10 ml), epinefrina 1:1000 (0,3 ml) e soro fisiológico 0,9% (30ml). Em alguns casos, além da infiltração inicial, em acordo com a necessidade, foram realizadas outras infiltrações entre as fases cirúrgicas para assegurar a anestesia no decorrer de todo o procedimento.

A maioria dos tumores ressecados sofreram o “debulking”, que consiste em enucleação ou retirada do tumor visível, antes da primeira fase cirúrgica (Figura 08). Esta técnica ou uma curetagem prévia permitem remoção da massa tumoral, agilizando o processo laboratorial da CMM além de, no caso da curetagem, permitir em alguns casos melhor delimitação da extensão do tumor.

Figura 08 - Enucleação da lesão “debulking”
(a) Demarcação da área a ser operada – CBC recidivado e cicatriz cirúrgica prévia. (b) “Debulking”. (c) Ferida cirúrgica resultante do debulking. (d) Realização da primeira fase cirúrgica após debulking.

Uma margem de 1 a 3 milímetros foi demarcada ao redor da área a ser removida dependendo da localização e características do tumor. Na figura 09 podem ser comparadas a demarcação da primeira fase cirúrgica com 1mm de margem e aquela com 5mm usualmente utilizados na cirurgia tradicional.

Foram então realizadas marcas de referência na lesão e pele sã com cortes de bisturi para permitir o mapeamento e orientação dos fragmentos. Neste momento um mapa da lesão removida e sua orientação na área acometida era desenhado em papel devidamente orientado ou fotografia permitindo identificação exata da área ainda comprometida em eventuais novas fases (Figura 09).

Figura 09 - Demarcação da lesão na pele, marcas de referência e mapa
 (a) Demarcação da área a removida na primeira fase da cirurgia micrográfica – CBC nodular e esclerodermiforme. (b) Demarcação com 5mm de margens utilizada na cirurgia convencional. (c) Debulk da lesão. (d) Marcas de referência realizadas com lâmina de bisturi no sentido vertical. (e) Marcas de referência já realizadas. (f) Mapeamento da lesão.

A retirada cirúrgica deve permitir a disposição de todas as margens, desde a epiderme até a margem profunda, em um único plano para a avaliação histopatológica. Sendo assim muitas vezes o corte da pele com o bisturi foi realizado com inclinação de 45° em relação à superfície da pele e paralelamente à superfície na profundidade. Esta inclinação normalmente é necessária em tecidos

rígidos como, por exemplo, da asa nasal. Em tecidos com menor rigidez, como os da região palpebral a inclinação não costuma ser necessária.

Após a retirada, a peça era dividida, na maioria dos casos, em fragmentos pré-marcados e codificada por cores com tinta para marcação tecidual, mantendo sua orientação. Desenhado com precisão, o mapa contendo a localização, forma, tamanho, orientação, divisão dos fragmentos e codificação de cores permitiu a exata localização das áreas que eventualmente seriam posteriormente removidas (Figura 10).

Figura 10 - Retirada da primeira fase cirúrgica, codificação e mapeamento
 (a) Corte da pele com inclinação de 45°. (b) Após corte de toda margem lateral com lâmina de bisturi. (c) Peça retirada. (d) Após divisão, codificação com cores.

Os fragmentos eram dispostos com as margens laterais e profundas num único plano, congelados e cortados no criostato com 3 a 12 μm de espessura a depender do tecido, sendo os cortes mais espessos em situações com tecido adiposo ocupando a maior parte do fragmento (Figura 11). Vários cortes de cada

fragmento foram obtidos (pelo menos 6) para maior segurança da análise. Os cortes, colocados em lâminas eram então devidamente identificados e corados por hematoxilina-eosina.

Figura 11 - Cortes no criostato

(a) Aplicação do meio para congelação. (b) Cortes no criostato. (c) Peças congeladas e marcadas com tinta. (d) Detalhe da peça com código de cores.

As lâminas eram então analisadas no microscópio e as áreas comprometidas pela neoplasia (caso houvesse) eram marcadas no mapa.

Nos casos em que neoplasia residual foi identificada nas margens, uma nova fase foi realizada apenas nas áreas comprometidas pelo tumor. A região ainda acometida era retirada e o tecido removido, mapeado, congelado e submetido a cortes no criostato, corado e analisado. O mesmo processo foi repetido sucessivamente até remoção completa da neoplasia.

Neste momento era decidida a conduta em relação à ferida cirúrgica, seja cicatrização por segunda intenção, enxerto, retalho ou fechamento primário (sutura direta) (Figura 12).

Figura 12 - Formas de reconstrução da ferida cirúrgica
(a) Enxerto de pele total. (b) Retalho – transposição. (c) Fechamento primário.

3.4 Análise Imuno-histoquímica (IHQ)

3.4.1 Princípios do método

IHQ é um conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para detecção de antígenos presentes em células ou tecidos. Estes podem ser constituintes celulares normais como, por exemplo, uma proteína de membrana, ou pertencer a um elemento estranho à célula como um micro-organismo. Os anticorpos utilizados podem ser mono ou policlonais e devem estar marcados com compostos que permitam posterior visualização seletiva (Hofman; Taylor, 2013).

Os anticorpos monoclonais são produzidos *in vitro* por clones de células plasmáticas. Reagem apenas com um epítopo presente no antígeno, são altamente homogêneos e reprodutíveis lote a lote. Já os anticorpos policlonais são produzidos *in vivo* por diferentes células sendo diferentes quanto às propriedades imunoquímicas, reagindo com vários epítopos diferentes presentes no antígeno contra o qual foram produzidos.

A técnica é essencialmente qualitativa, embora métodos quantitativos possam ser aplicados em preparações IHQ para se determinar o número de elementos presentes ou a intensidade da reação. O objetivo da técnica é a identificação e localização topográfica de antígenos nos tecidos ou células. Seu resultado não depende isoladamente da reação (positiva ou negativa), mas sim da interpretação conjunta com achados morfológicos e clínicos (Brasileiro Filho et al., 2006).

3.4.2 Execução do método

As amostras de pele foram fixadas e inseridas em bloco de parafina e posteriormente cortadas com 4µm de espessura e submetidas à reação de IHQ, utilizando o método de HRP-polímero. Os anticorpos utilizados foram os monoclonais Ber-EP4 (clone Ber-Ep4 (4), Dako, Dinamarca), MNF116 (clone

NF116, Dako, Dinamarca), VEGF (clone G153-694, BD, Estados Unidos) e E-Caderina (clone 36/E-Cadherin, BD, Estados Unidos) (Tabela 03).

As lâminas silanizadas com cortes parafinados de fragmentos do tumor foram submetidas a etapas consecutivas de desparafinização em xilol, álcool graduado e lavagem em água. Posteriormente, recuperação antigênica e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% para todos os anticorpos. Para todos os anticorpos, a recuperação antigênica ocorreu em panela a vapor por 40 minutos com tampão de citrato de sódio 10mMol/L pH6,0. Em seguida, foi realizado o bloqueio da reação proteica inespecífica com *Protein Block Kit* (*EasyLink HRP-Polymer kit with DAB*; Immunobioscience Corp., USA) por 30 minutos. O anticorpo primário Ber-EP4 foi diluído em albumina de soro bovino (BSA) na concentração 1/200, o MNF116 foi diluído em 1/100, a E-Caderina em 1/1000 e o anticorpo VEGF em 1/2000. Após incubação *overnight*, as lâminas foram lavadas por três vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário e polímero (*EasyLink HRP-Polymer kit with DAB*; Immunobioscience Corp., USA). A revelação da reação foi feita em solução de diaminobenzidina (DAB) por 1 minuto em temperatura ambiente. As lâminas foram posteriormente lavadas e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 40 segundos, também em temperatura ambiente. Após este processo, foram submetidas à aplicação de hidróxido de amônia, desidratação com álcool, diafanização em xilol e finalmente, foi executada a montagem das mesmas em lâminas Knittel (Knittel Glass, Germany).

Os controles positivos para os anticorpos (Tabela 03) foram todos obtidos do arquivo do SERPAT do HCFMRP-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 03 – Relação dos anticorpos primários

Anticorpo	Fonte	Clone	Diluição	Controle positivo
Ber-EP4	1	Ber-EP4	1:200	Amígdala humana
MNF116	1	MNF116	1:100	Amígdala humana
VEGF	2	G153-694	1:2000	Amígdala humana
E-Caderina	2	36/E-Cadherin	1:1000	Amígdala humana

Legenda: 1: Dako, Denmark; 2: BD, USA.

Procedeu-se a análise da imunomarcação para a expressão dos anticorpos nos cortes histológicos de amostras do tumor, que foi realizada por meio de um sistema de captação de imagens com o *software* Axiovision 4.0 Carl Zeiss Vision, que inclui um microscópio (Zeiss Imager M1c) acoplado à uma câmera colorida (Axiocam MRc5) e um computador, do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental da FMRP-USP. Para a análise da imunomarcação com os anticorpos Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina, realizou-se o cálculo de intensidade de marcação e a porcentagem de área tumoral marcada pelos anticorpos com auxílio do *software* Image J (versão 1.49, National Institute of Health, USA) (Figura 13).

Figura 13 - Delimitação do tumor através da seleção automática no *software* Image J v1.49
(a) CBC esclerodermiforme (H&E 10X). (b) Imunomarcação com Ber-EP4 (10X). (c) Seleção automática (10X). (d) Seleção automática – detalhe.

Para análise de intensidade utilizando o Image J, utilizamos a escala de cinza do programa, que varia de zero (marcação de preto – mais intensa) a 255 (marcação branca – menos intensa). Como as lâminas da reação IHQ apresentam um background de marcação em tom azulado, a média de escala de cinza para os controles negativos foi de 150. Dessa forma, para os tumores marcados, a escala de cinza variou de 0 a 150 (Figura 14).

Figura 14 - Conversão da imagem para 8-bit
 (a) CBC esclerodermiforme delimitado através da seleção automática. (b) Eliminação do fundo. (c) Imagem convertida para 8-bit. (d) detalhe da imagem convertida.

Após coleta da imagem na escala de cinza, utilizou-se a demarcação com limiar *<threshold>* com limites para demarcação intra-tumoral para determinação de porcentagem de células tumorais marcadas, com resultados variando de zero a 1 (0 a 100%) (Figura 15). O limiar máximo foi determinado em

127 da escala de cinza para análise de todos os tumores (metade da escala de cinza tradicional e 85% da escala de cinza até o *background* da IHQ).

Figura 15 – Determinação de porcentagem da área imunomarcada pelos anticorpos através de limiar de detecção
 (a) CBC nodular e micronodular – escala de cinza. (b) CBC nodular e micronodular – área demarcada através de limiar de detecção.
 (c) CBC esclerodermiforme – escala de cinza. (d) CBC esclerodermiforme – área demarcada através de limiar de detecção.

Com os dados de escala de cinza da marcação global do tumor, utilizou-se uma fórmula matemática ($150 - \text{valor na escala cinza}$) para transformar essa medida em intensidade de marcação (I), que por convenção transformou o valor 150, aquele corresponde ao mais intenso (preto) e zero, ao menos intenso (*background*), conforme ilustrado na figura 16.

Figura 16 – Fórmula para transformação de escala de cinza em intensidade de marcação

De modo a obter um valor por meio da análise dos dois parâmetros, em seguida foi calculado um escore pela multiplicação da intensidade (zero a 150) pela porcentagem da área marcada (0 a 1): $\text{Escore} = \text{Intensidade} \times \% \text{Área}$, com valores do escore variando entre zero a 150.

Para contagem de células inflamatórias do VEGF, uma média de 8 a 10 campos com células marcadas foram selecionados de cada lâmina para a análise quantitativa. As células foram consideradas positivas para todos os marcadores na presença de imunoprecipitado castanho ao redor da membrana plasmática das células inflamatórias. As células positivas foram quantificadas em 1.000 células/biópsia, estabelecendo a porcentagem de expressão IHQ de VEGF, com o auxílio do *software* Image J versão 1.49 (Figura 17).

Figura 17 – Exemplo de contagem de células marcadas com o anticorpo anti-VEGF, mostrando em azul células inflamatórias negativas e em rosa as células positivas para VEGF. Realizado no *software* Image J v1.49.

3.5 Análise Estatística

Para execução da análise estatística foi utilizado o programa IBM® SPSS® Statistic v17.0 (International Business Machines Corporation, *NY, USA*) e para construção dos gráficos o programa Minitab® Statistical Software v16.1 (Minitab Inc., *PA, USA*).

Para análise estatística, utilizamos os seguintes critérios: para cruzamento de dados entre as variáveis categóricas (número de fases cirúrgicas, sexo, idade categorizada, localização, tamanho do tumor, condição de primário ou recidivado, dificuldade para delimitação, incompleta remoção, risco histológico, número de critérios e tamanho do defeito cirúrgico final), realizou-se o teste Qui-quadrado (X^2) e o teste exato do Qui-quadrado (X^2).

Para cruzamento entre variáveis numéricas realizou-se testes de normalidade.

4 RESULTADOS

4.1 Análise descritiva

Foram selecionados 101 pacientes adultos atendidos no Ambulatório de Tumores Cutâneos do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (HCFMRP-USP) com diagnóstico clínico de carcinoma basocelular (CBC) com indicação prévia de tratamento cirúrgico, especificamente, a cirurgia micrográfica de Mohs (CMM), no período de janeiro de 2011 a 2014.

No grupo, 41,6% [42/101] dos pacientes eram do sexo masculino e 58,4% [59/101], do feminino (Gráfico 01), com a média de idade de 60,2 anos, a mínima de 24 anos, e a máxima 86 anos. Entre os homens, a idade média foi de 63,1 anos, a mínima de 39 anos e a máxima de 84 anos; e entre as mulheres, a idade média foi de 58,1, a mínima de 24 anos e a máxima de 86 anos, como observado na tabela 04. A maior parte dos casos concentrou-se entre 46 e 75 anos (Gráfico 02).

Tabela 04 - Dados demográficos dos indivíduos com CBC submetidos à CMM
HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Grupo de Estudo	Masculino	Feminino	Total
n (%)	42 (41,6%)	59 (58,4%)	101 (100%)
Idade, anos (média)	63,1	58,1	60,2
Idade, anos (mínima-máxima)	24 – 86	39 – 84	24 – 86

Gráfico 01 - Distribuição segundo sexo dos CBC excisados (n=101) por CMM HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Gráfico 02 - Distribuição por faixa etária dos indivíduos com CBC submetidos à CMM HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Em relação à topografia dos tumores, a maioria localizava-se no segmento cefálico. A região nasal foi a mais frequentemente acometida, no total por 53 (52,48%) tumores, seguida pela região periorbital com 15 (14,85%). Os demais acometiam as regiões do sulco nasolabial 6 (5,94%), perioral 5 (4,95%), malar 5 (4,95%), temporal 5 (4,95%), auricular (3,96%) couro cabeludo 3 (2,97%), frontal 3 (2,97%), tronco 1 (0,99%) e perna 1 (0,99%) (Gráfico 03).

Gráfico 03 - Distribuição dos CBC submetidos à CMM (n=101) em acordo com a topografia
HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Foram submetidos à CMM, 50 (49,5%) tumores recidivados e 51 (50,5%) primários (Gráfico 04).

Gráfico 04 - Distribuição dos CBC (n=101) submetidos à CMM segundo a condição de primário ou recidivado HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Dentre os tumores recidivados, 5 (4,95%) apresentavam mais de uma recidiva. Todos haviam sido submetidos à cirurgia convencional (100%), e quatro (3,96%), adicionalmente à radioterapia (Figura 18).

Figura 18 - CBC esclerodermiforme recidivado após cirurgia e radioterapia acometendo a região nasal

Os tumores foram então classificados em acordo com o risco histopatológico decorrente da presença de componentes de maior ou menor agressividade, ou seja, os padrões histológicos esclerodermiforme, infiltrativo, micronodular ou metatípico definiram CBC de **alto risco** (grupo A), e os padrões sólido ou superficial, CBC de **baixo risco** (grupo B), conforme pode ser observado na tabela 05. Os tumores que apresentaram na histopatologia mais de um padrão foram classificados como alto risco, caso houvesse qualquer tipo histológico que os incluísse nesse grupo.

Tabela 05 – Características dos CBC (n=101) submetidos à CMM em acordo com o risco histológico
HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

CARACTERÍSTICAS	PRIMÁRIO N (%)	RECORRENTE N (%)	TOTAL N(%)
<i>Tipo histopatológico*</i>			
Esclerodermiforme	17 (16,83)	22 (21,78)	Alto Risco (Grupo A)
Infiltrativo	02 (1,98)	03 (2,97)	
Micronodular	10 (9,90)	11 (10,89)	
Metatípico	04 (3,96)	01 (0,99)	
Sólido	15 (14,85)	13 (12,87)	Baixo Risco (Grupo B)
Superficial	03 (2,97)	00	
Total	51 (50,50)	50 (49,50)	

* Na presença de mais de um padrão na histopatologia, o componente de alto risco foi determinante para esta definição

Entre os tumores tratados pela CMM, 31 (30,69%) classificavam-se como de baixo risco e 70 (69,31%) como de alto risco conforme pode ser observado no gráfico 05.

Gráfico 05 - Distribuição dos CBC submetidos à CMM (n=101) em acordo com o risco histológico HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

No grupo dos tumores primários, 33 (64,7%) foram classificados como de alto risco e 18 (35,3%) de baixo risco. Entre os recidivados, 37 (74%) encontravam-se entre os de alto risco e 13 (26%) entre os de baixo risco (Gráfico 06).

Gráfico 06 - Relação entre a condição de primário ou recidivado e o risco determinado pelo padrão histológico dos CBC excisados (n=101) por CMM HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Na sequência, a amostra dos CBC excisados por CMM (n=101) foi analisada em acordo com o número de componentes, o padrão histopatológico predominante, e a condição de primário ou recorrente, como mostra a tabela 06.

O padrão histológico predominante refere-se ao componente observado com maior preponderância nos cortes histológicos congelados, incluindo os cortes do “debulking” e das margens do tumor realizados durante a CMM.

Tabela 06 – Características dos CBC (n=101) submetidos à CMM em acordo com o número de componentes e o padrão histopatológico predominante HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

CARACTERÍSTICAS	PRIMÁRIO N (%)	RECORRENTE N (%)	TOTAL N(%)
<i>Número de componentes no padrão histopatológico</i>			
Um componente	22 (43,14)	32 (64)	54 (53,5)
Dois componentes	27 (52,94)	14 (28)	41 (40,6)
Três ou mais componentes	02 (03,92)	04 (08)	06 (05,9)
<i>Padrão histopatológico (predominante)</i>			
Esclerodermiforme	10 (19,61)	18 (36)	
Infiltrativo	01 (01,96)	01 (02)	
Micronodular	05 (09,80)	12 (24)	
Metatípico	03 (05,89)	01 (02)	
Sólido	26 (50,98)	17 (34)	
Superficial	06 (11,76)	01 (02)	
Total	51 (50,5)	50 (49,5)	101 (100)

Na amostra, 53,5% (54/101) dos tumores ressecados apresentaram um padrão histológico e 46,5% (47/101) mais de um padrão histológico na mesma lesão (Figura 19), sendo 40,6% (41/101) dois padrões e 5,9% (6/101) três padrões

ou mais. Em 34 (33,7%) foi notada a coexistência de subtipos histológicos de alto risco e baixo risco na mesma lesão, como ilustra a figura 19 e o gráfico 07.

Figura 19 - Coexistência de múltiplos padrões histológicos nos CBC excisados: Lâminas obtidas durante as fases da cirurgia micrográfica de Mohs (H&E 10X) (a) CBC nodular e micronodular. (b) CBC nodular e esclerodermiforme. (c) CBC superficial e micronodular. (d) CBC ceratótico, com componentes nodular, superficial e esclerodermiforme. (e) CBC superficial e nodular. (f) CBC superficial, nodular e infiltrativo.

Gráfico 07 - Distribuição segundo o subtipo histológico e o risco determinado pelo padrão histológico dos CBC excisados por CMM (n=101)

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Considerando o padrão histológico predominante entre os CBC recidivados, foi observada a seguinte distribuição: esclerodermiforme (36%), micronodular (24%), infiltrativo (1%), metatípico (1%), sólido (34%) e superficial (1%). Entre os tumores primários: subtipo nodular (51%), superficial (11,8%), esclerodermiforme (19,6%), micronodular (9,8%), metatípico (5,9%) e infiltrativo (1,9%) [Tabela 06; Gráfico 08].

Na análise da distribuição de cada subtipo segundo a condição de primário ou recidivado, notadamente entre os subtipos micronodulares e esclerodermifomes, predominaram os tumores recidivados; e entre os superficiais e nodulares, predominaram os primários, como observado no gráfico 08.

Gráfico 08 - Relação entre a condição de primário ou recidivado e os padrões histopatológicos predominantes nos CBC submetidos a CMM (n=101) HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Na análise da indicação da CMM, por meio da aplicação dos critérios de Rotterdam, expressiva maioria dos tumores excisados (97%) apresentou mais de um critério para indicação de CMM: apenas três tumores (2,95%) apresentaram um critério; 23 (22,8%) dois critérios; 46 (45,5%) três critérios; 28 (27,7%) quatro critérios; e um tumor (0,99%) cinco critérios.

Em 92 tumores (91,1%) o critério localização esteve presente; em 72 (71,3%) o tamanho; em 70 (69,3%) o tipo histológico de alto risco; em 70 (69,3%) a recidiva; em 12 (11,9%) a imprecisão da delimitação do tumor; em 7 (6,9%) margens comprometidas (Figura 20; Tabela 07).

Figura 20 - CBC incompletamente removido submetido à CMM
 (a) Marcação da lesão. (b) Após a primeira fase cirúrgica, detecção de áreas ainda comprometidas. (c) Áreas ainda acometidas observadas macroscopicamente na lâmina obtida por congelação. (d) Defeito cirúrgico final. (e) Desenho do retalho em transposição. (f) Pós-operatório imediato.

Tabela 07 - Motivos da indicação da CMM para os CBC excisados

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Indicação da CMM	Número de Tumores	Porcentagem (%)
Localização	72	71,3
Tipo histológico	70	69,3
Tamanho	70	69,3
Recidiva	50	49,5
Delimitação imprecisa	12	11,9
Comprometimento de margens	7	6,93

A presença de maior número de critérios foi determinante para a realização de um maior número de fases para a sua excisão total e da extensão subclínica do tumor (≥ 3 fases), como ilustrado no gráfico 09.

Na comparação entre os grupos, aqueles que realizaram ≥ 2 fases e ≥ 3 fases apresentaram maior número de critérios de indicação para a CMM (teste Mann-Whitney; $p = 0,02$ e $p = 0,03$ respectivamente).

Gráfico 09 - Relação entre o número de critérios para indicação de CMM e o número de fases cirúrgicas para completa remoção dos CBC excisados (n=101)

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Em relação ao número de fases cirúrgicas, verificou-se que 40 tumores (39,6%) necessitaram de duas ou mais fases para sua completa remoção, sendo uma fase para 61 (60,40%), duas fases para 29 (28,71%) e três ou mais fases para 11 tumores (10,89%). O número de fases variou de 1 a 9. A tabela 08 relaciona o número de fases, recidiva e risco histológico dos tumores ressecados.

Tabela 08 - Distribuição dos CBC excisados segundo o número de fases na CMM, recidiva e padrão do risco histológico

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Número de fases	1 n (%)	2 n (%)	3 ou mais n (%)
Amostra geral	61 (60,4)	29 (28,71)	11 (10,89)
Primários	36 (70,59)	11 (21,57)	4 (7,84)
Recidivados	25 (50)	18 (36)	07 (14)
Alto risco histológico	42 (60)	20 (28,57)	08 (11,43)
Baixo risco histológico	19 (61,3)	09 (29,03)	3 (9,67)
Histologia predominante de alto risco	28 (54,90)	18 (35,29)	5 (9,80)
Histologia predominante de baixo risco	33 (64)	11 (24)	6 (12)

Trinta e seis (70,6%) entre 51 tumores primários foram completamente removidos com apenas uma fase cirúrgica. Dentre os recidivados, apenas vinte e cinco entre os 50 (50%) puderam ser removidos com uma única fase. O gráfico 10 relaciona o número de fases necessárias para completa remoção do tumor com a condição de primário ou recorrente.

Gráfico 10 – Relação entre o número de fases para completa remoção do tumor e a condição de primário ou recidivado dos CBC excisados por CMM (n=101)

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Em relação ao número de fases e a condição de primário ou recorrente, a segunda condição elevou significativamente as chances da necessidade de 2 ou mais fases para a sua remoção completa (OR=2,40 I.C.95% 1,06 – 5,44; teste do $X^2 = 4,47$, $p = 0,03$), mas não elevou as chances da realização de 3 ou mais fases (teste do $X^2 = 0,99$ $p = 0,35$; OR = 1,91 I.C. 95% 0,52 – 6,99).

O critério idade não foi associado com o aumento das chances da execução de ≥ 2 fases versus 1 fase na CMM, quando os indivíduos foram classificados por grupos de faixa etária (até 35 anos, de 36 a 45, 46 a 55, 56 a 65, 66 a 75 e maior que 75 anos), (teste exato do X^2 ; $p = 0,31$). No entanto, a faixa etária de 61-70 é significativamente superior no grupo em que realizou ≥ 3 fases versus o grupo daqueles que realizaram uma ou duas fases (63,6% x 22,2%; teste exato do X^2 ; $p = 0,03^*$). Contrariamente, o percentual de indivíduos na faixa etária de 71-80 é significativamente superior no grupo que realizou uma ou duas fases na CMM (26,7% x 0,0%). No entanto, na comparação para variáveis numéricas, utilizando-se o teste t para amostras independentes, há forte tendência para os

indivíduos com maior idade apresentarem maior número de fases cirúrgicas ($p=0,06$), Gráfico 11.

Gráfico 11 - Relação entre o número de fases cirúrgicas para completa remoção do tumor e a idade dos pacientes submetidos à CMM (n=101)
HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Na amostra do estudo, não foram observadas diferenças entre os sexos quando considerado o número de fases cirúrgicas, na comparação uma fase versus duas ou mais fases (teste do $X^2 = 1,93$; $p = 0,17$; OR = 1,77; I.C. 95% 0,79 – 3,99), ou do risco de extensão subclínica, definida como a realização de três ou mais fases (teste exato do $X^2 p = 0,19$; OR = 2,75; I.C. 95% 0,75 – 10,09).

Na análise da relação entre os subtipos histológicos, definidos pelo componente de maior risco presente no tumor, e o número de fases, as frequências dos subtipos nodular; superficial, micronodular, esclerodermiforme/infiltrativo não diferiram nos grupos 1 fase versus ≥ 2 fases; como também não diferiram quando agrupados em 1 fase ou 2 fases versus ≥ 3 fases (teste exato do $X^2 p = 0,74$ e $p = 0,68$ respectivamente).

Na sequência, os tumores foram agrupados em acordo com o subtipo histológico como não agressivos ou agressivos, onde a presença de qualquer componente de alto risco os incluiu neste último grupo. Na amostra do estudo, não foi observada associação entre risco histológico e o número de fases, na comparação 1 fase versus ≥ 2 fases (teste do $X^2 = 0,02$ $p = 0,92$; OR = 0,95 I.C. 95% 0,40 – 2,25); 1 ou 2 fases versus ≥ 3 fases (teste exato do X^2 , $p = 1,00$; OR = 0,83 I.C. 95% 0,21 – 3,37) [Tabela 08; Gráfico 12].

Gráfico 12 – Relação entre número de fases para completa remoção e padrão de risco histológico e tipo histológico predominante dos CBC excisados por CMM (n=101)

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Em relação à localização, para os tumores da região nasal a frequência da realização de ≥ 2 fases versus 1 fase foi significativamente elevada (teste exato do X^2 ; $p = 0,04$; 67,5% x 42,6%), mas sem atingir significância na frequência da realização de mais de três fases na CMM (teste exato do X^2 ; $p = 0,35$).

Quando agrupados na localização área H da face ou outras localizações, os tumores da zona H apresentaram 4,1 vezes mais chance de realização de duas ou mais fases versus uma fase comparados aos das outras localizações (teste do $X^2 = 3,66$; $p = 0,056$; OR = 4,18; I.C. 95% 0,87–20,00), conforme observado no gráfico 13. No entanto, não houve aumento do risco para a realização de mais de 3 fases (teste exato do X^2 ; $p = 0,35$).

Gráfico 13 – Relação entre número de fases para completa remoção e localização dos CBC excisados por CMM (n=101)

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

A medida das lesões no seu maior eixo variou de 4mm a 120mm (média = 25,3 mm), sendo que 57 lesões (56,4%) apresentavam 20mm de diâmetro ou mais no seu maior eixo.

A relação entre o número de fases cirúrgicas e a dimensão dos tumores excisados pode ser observada no gráfico 14. Nos tumores com 20mm de diâmetro ou mais foram realizadas duas ou mais fases em 45,6% (26/57); nos tumores com 19 mm ou menos essa frequência foi 31,8% (14/44). Adicionalmente, apenas 4,5%

(2/44) dos tumores com 19 mm ou menos necessitaram de 3 fases, frente a 15,8% (9/57) dos com 20mm ou mais, como mostra o gráfico 15.

Gráfico 14 - Relação entre a dimensão dos CBC excisados (n=101) e o número de fases (≥ 2) realizadas na CMM
HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

No entanto, entre os tumores ≥ 20 mm não houve aumento significativo da frequência da execução de mais de 2 fases versus 1 fase (47,5% x 52,5%; teste do $X^2 = 0,24$, $p = 0,63$, OR = 1,22 I.C. 95% 0,55 – 2,71); ou da execução de 3 fases versus uma ou 2 fases (teste do $X^2 = 0,99$ $p = 0,32$, OR = 1,91, I.C. 95% 0,52 – 6,99).

Gráfico 15 - Relação entre a dimensão dos CBC (n=101) e o número de fases (≥ 3) realizadas na CMM
HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Na análise do diâmetro do defeito cirúrgico final em relação ao tamanho inicial da lesão, pôde ser observado em média um aumento de 31,5% no maior diâmetro em relação à lesão inicial, sendo de 29,4% quando tratados os tumores primários e de 33% quando tratados os recidivados (Gráfico 16).

Gráfico 16 – Proporção de aumento do defeito cirúrgico em relação à dimensão inicial dos CBC excisados por CMM (n=101)

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

No grupo de tumores com defeito cirúrgico final < 10 mm foi observada significativa frequência da realização de 1 fase comparada à 2 ou mais fases (14,8% X 2,5%; teste do $X^2 = 9,09$ $p = 0,06$); e nos tumores com defeito cirúrgico final ≥ 40 mm, a realização de ≥ 3 fases foi significativamente mais elevada (54,5% > 17,8%; teste exato do X^2 $p = 0,03$).

Entre os tumores considerados mal delimitados (n=12; 11,9%), não houve diferenças significativas na frequência da execução 1 fase versus 2 ou mais fases (teste exato do X^2 $p = 0,53$ OR= 1,62 I.C. 95% 0,48 – 5,42); ou na execução de 1 ou 2 fases versus 3 fases (teste exato do X^2 $p = 0,12$ OR = 3,38 I.C. 95% 0,76 – 15,05).

Para aqueles tumores submetidos à CMM cuja indicação foi incisão incompleta, também não houve diferenças significativas na execução de 1 fase versus 2 ou mais fases (teste exato do X^2 $p = 0,70$ OR = 0,59 I.C. 95% 0,11 – 3,20); ou na execução de 1 ou 2 fases versus 3 fases (teste exato do X^2 $p = 0,60$).

Dentre os 101 tumores ressecados, particularmente quatro haviam sido submetidos à radioterapia. Na histopatologia, todos estes quatro tumores apresentavam padrão esclerodermiforme, mas dois em associação ao padrão micronodular. A média do número de fases necessárias para remoção destes tumores foi de 3,5 versus 1,6 fases, quando comparados aos tumores da amostra geral (Gráfico 17).

Gráfico 17 – Relação entre tratamento prévio por radioterapia e o número de fases realizadas na CMM para tratamento dos CBC (n=4)
HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Na comparação do diâmetro do defeito cirúrgico final em relação ao tamanho inicial da lesão notou-se aumento médio de 143,5% no maior diâmetro entre os tumores previamente submetidos a radioterapia versus 31,49% quando consideramos todos os tumores ressecados, ou seja, média de 4,95 cm para a diferença entre maior diâmetro inicial do tumor e defeito cirúrgico final versus 0,79 cm para a amostra geral dos tumores ressecados (Gráfico 18).

Gráfico 18 - Relação entre a variação do tamanho da ferida cirúrgica e o tratamento prévio por radioterapia dos CBC excisados por CMM (n=4)

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Considerando-se a forma de reconstrução da ferida cirúrgica, houve emprego de: retalho isolado em 30 (29,7%) pacientes (Figuras 21 e 22); enxerto isolado em 31 (30,7%) pacientes (Figura 23); fechamento primário em 25 (24,75%) pacientes (Figura 24); fechamento por segunda intenção em 4 (3,96%) pacientes (Figura 25); associação de retalho com enxerto em 7 (6,93%) pacientes e fechamento primário associado a enxerto (enxerto de Burrow) em 4 (3,96%) pacientes (Figura 26), conforme observado no gráfico 19.

Figura 21 - Retalho em rotação
(a) Lesão inicial. (b) Confeção de retalho em rotação para reconstrução de defeito cirúrgico. (c) Sétimo dia de pós-operatório. (d) Dois meses de pós-operatório da micrográfica de Mohs.

Figura 22 - Retalho em Transposição

(a) Confeção de retalho em transposição para reconstrução do defeito cirúrgico na região do dorso nasal. (b) Pele a ser transposta. (c) Sétimo dia de pós-operatório. (d) Dois meses de pós-operatório.

Figura 23 - Enxerto de pele total
(a) Carcinoma basocelular recidivado acometendo o dorso nasal. (b) Defeito cirúrgico final após cirurgia micrográfica de Mohs. (c) Reconstrução por enxerto de pele total no pós-operatório imediato. (d) Dois anos de pós-operatório.

Figura 24 - Fechamento primário
(a) Carcinoma bascelular recidivado acometendo o dorso nasal. (b) Defeito cirúrgico final após cirurgia micrográfica de Mohs. (c) Reconstrução por aproximação – borda a borda. (d) Sétimo dia de pós-operatório.

Figura 25 - Fechamento por segunda intenção
(a) Carcinoma basocelular primário adjacente ao ponto lacrimal. (b) Defeito cirúrgico final após cirurgia micrográfica de Mohs. (c) Detalhe do defeito cirúrgico final. (d) Dois meses de pós-operatório.

Figura 26 - Enxerto de Burrow
(a) Defeito cirúrgico final após cirurgia micrográfica de Mohs na região frontal à direita. (b) Desenho da orelha a ser retirada e utilizada como enxerto de pele total. (c) Pós-operatório imediato. (d) Sétimo dia de pós-operatório.

Gráfico 19 - Distribuição dos CBC excisados (n=101) por CMM em acordo com a forma de reconstrução do defeito cirúrgico

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Ainda em relação à forma de reconstrução da ferida cirúrgica, houve predomínio de reconstruções por enxertos ou retalhos para defeitos com maiores diâmetros quando comparamos com as outras formas de reconstrução, com valores significativamente superiores quando comparados ao fechamento primário, como mostra a tabela 09 (enxerto e retalho com valores significativamente superiores ao do fechamento primário; teste post hoc de Dunn $p < 0,001$ para ambos).

Tabela 09 - Distribuição das formas de reconstrução segundo o maior diâmetro do defeito cirúrgico final das CMM

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

Reconstrução	N	Média do maior diâmetro final
Retalho	37	58,54
Enxerto	35	59,54
Fechamento primário	25	27,52
Segunda intenção	04	53,25
Total	101	

4.2 Imunomarcação de carcinomas basocelulares excisados por CMM

A reação imuno-histoquímica com os anticorpos Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina mostrou elevada especificidade na marcação das células neoplásicas e delimitação do tecido tumoral (Figuras 27 a 32). Já o anticorpo anti-VEGF evidenciou marcação de células do infiltrado inflamatório peritumoral e das células endoteliais dos vasos neoformados, e negativa nos tumores (Figura 33).

A seguir descreveremos os resultados obtidos com ilustrações dos padrões da marcação dos anticorpos nos subtipos de CBC excisados. Na sequência, os resultados obtidos da análise de intensidade e porcentual de área marcada pelos anticorpos, por meio do método proposto e auxílio do *software* Image J, seguida dos resultados da análise estatística da comparação entre os subtipos.

A coexistência de componentes de baixo e alto risco pôde ser observada em alguns tumores, como ilustrada nas figuras 29 e 30.

Nos tumores com intenso processo inflamatório peritumoral, a imunomarcação com Ber-EP4 e MNF116 evidenciou os ninhos de células tumorais (Figuras 31 e 32).

Figura 27 - Aspectos histológicos e imunomarcação para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC superficial
 (a) CBC superficial mostrando proliferação de células basalóides que se ligam à epiderme e formam discreta paliçada (H&E 10x). (b) Ber-EP4 com marcação tumoral intensa e homogênea, mais evidente na região de paliçada, poupando epiderme (10x). c) MNF116 com marcação tumoral intensa e homogênea, também evidente em epiderme (10x). d) E-Caderina com marcação tumoral moderada, também evidente na epiderme (10x).

Figura 28 - Aspectos histológicos e imunomarcção para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC nodular
 (a) CBC nodular com ninhos de células basalóides na derme, fenda entre tumor e estroma e paliçada na periferia (H&E 10x). b) Ber-EP4 com marcação intensa tumoral, mais evidente na região de paliçada e região central com marcação moderada (10x). c) MNF116 com marcação intensa tumoral, mais evidente na região de paliçada (10x). d) E-Caderina com marcação tumoral moderada na região central e mais evidente na região de paliçada (10x).

Figura 29 - Aspectos histológicos e imunomarcção para Ber-EP4 e MNF116 e E-Caderina em CBC nodular e micronodular
 (a) CBC nodular e micronodular (H&E 10x). (b) Ber-EP4 com marcação tumoral moderada no componente nodular e intensa no micronodular (10X). (c) MNF116 com marcação tumoral intensa no componente micronodular e moderada no componente nodular (10x). (d) E-Caderina com marcação tumoral moderada e homogênea no componente micronodular e leve e heterogênea no nodular, mais evidente na região de paliçada (10x).

Figura 30 - Aspectos histológicos e imunomarcção para Ber-EP4 e MNF116 e E-Caderina em CBC esclerodermiforme com componente superficial (a) CBC esclerodermiforme com cordões de células basalóides na derme e fibrose ao redor dos cordões tumorais (H&E 10x). (b) Ber-EP4 com marcação tumoral levemente heterogênea (10x). c) MNF116 com marcação tumoral intensa e homogênea (10x). (d) E-Caderina com marcação tumoral moderada e homogênea (10x).

Figura 31 - Aspectos da imunomarcção para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC infiltrativo com intenso infiltrado inflamatório

(a) CBC infiltrativo com intenso infiltrado inflamatório, que dificulta a observação dos cordões de células basalóides na derme (H&E 10x). (b) Ber-EP4 com marcação tumoral levemente heterogênea e mais intensa na periferia evidenciando as células tumorais (10x). (c) MNF116 com marcação homogênea do tumor e epitélio, evidenciando as células tumorais em meio ao infiltrado inflamatório (10x). (d) E-Caderina exibindo marcação moderada e levemente heterogênea, mais intensa na periferia, evidenciando as células tumorais (10x).

Figura 32 - Aspectos da imunomarcção para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC esclerodermiforme com intenso infiltrado inflamatório
(a) CBC esclerodermiforme com intenso infiltrado inflamatório que dificulta a observação dos cordões de células basalóides na derme e fibrose ao redor dos cordões tumorais (H&E 10x). b) Ber-EP4 com marcação tumoral homogênea evidenciando as células tumorais (10x). c) MNF116 com marcação homogênea evidenciando as células tumorais (10x). (d) E-Caderina exibindo marcação moderada e levemente heterogênea, evidenciando as células tumorais em meio ao infiltrado inflamatório (10x).

Figura 33 - Aspectos da imunomarcção para VEGF em CBC com componentes esclerodermiforme, micronodular e nodular
 (a) Presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos, com marcação efetiva do anticorpo anti-VEGF na maioria destas células, sem marcação das células tumorais (10x). (b) Processo inflamatório com mesmo aspecto de marcação que o anterior (10x). (c) Processo inflamatório peri-tumoral evidenciando a marcação seletiva (10x). (d) Processo inflamatório peri-tumoral com marcação efetiva do anticorpo anti-VEGF, sem marcação das células tumorais (10x).

Como descrito anteriormente, por meio do método proposto e auxílio do *software* Image J, realizou-se a análise e mensuração da intensidade e do percentual de área marcada pelos anticorpos. Em acordo com a descrição prévia, primeiramente as áreas tumorais foram demarcadas e, em seguida, as imagens convertidas para 8-bits em escala de cinza. Na sequência, mensuração da área tumoral demarcada e da intensidade de marcação. Após esta leitura, mediu-se o limiar de cada célula com nível de escala de cinza em 127 (metade exata da escala e 85% do valor da escala dos tumores), para quantificar o percentual de células marcadas na reação IHQ (Figuras 34, 35 e 36).

Figura 34 - Estabelecimento de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas pela IHQ em CBC nodular
 Análise no software Image J: (a) CBC com componente nodular corado pelo Ber-EP4 e demarcado pelo *software*. (b) Retirada de background para análise somente da área tumoral. (c) Figura em 8-bits para análise de escala de cinza. (d) Análise de limiar (*threshold*) para quantificação de células marcadas pelo Ber-EP4.

Figura 35 - Estabelecimento de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas pela IHQ em CBC esclerodermiforme
 Análise no software Image J: (a) CBC com componentes nodular e esclerodermiforme corado pelo MNF116 e demarcado pelo *software*. (b) Retirada de background para análise somente da área tumoral. (c) Figura em 8-bits para análise de escala de cinza. (d) Análise de limiar (*threshold*) para quantificação de células marcadas pelo MNF116.

Figura 36 - Estabelecimento de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas pela IHQ em componente nodular de CBC
 Análise no software Image J: (a) Componente nodular de CBC corado pela E-Caderina. (b) Retirada de background para análise somente da área tumoral. (c) Figura em 8-bits para análise de escala de cinza. (d) Análise de limiar (*threshold*) para quantificação de células marcadas pela E-Caderina.

Para análise integrada de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas na IHQ, adotou-se um escore, cujo valor é a multiplicação da intensidade de marcação pelo percentual de células marcadas pelo anticorpo, com variação de 0 a 150.

Foram avaliados 53 cortes, correspondentes a 11 tumores de alto risco histológico, sendo 7 do subtipo esclerodermiforme e 3 do subtipo micronodular.

Esta análise mostrou, pelo cálculo das médias de intensidade de marcação do anticorpo Ber-EP4, uma marcação mais intensa no subtipo micronodular quando comparado ao esclerodermiforme. (Tabela 10).

A análise para o anticorpo MNF116 mostrou desempenho semelhante na marcação dos tipos, com valores discretamente superiores para o subtipo esclerodermiforme (Tabela 10).

Já a E-Caderina, evidenciou valores menores da intensidade de marcação comparado aos demais anticorpos. A marcação foi mais acentuada no subtipo micronodular comparado ao esclerodermiforme (Tabela 10).

A análise dos valores médios do escore mostrou que para o anticorpo Ber-EP4, notou-se valor elevado de escore no subtipo micronodular comparado ao esclerodermiforme. Há tendência a discreta inversão para a marcação com MNF116. Já a E-Caderina mostrou maior pontuação para o subtipo micronodular quando comparado ao esclerodermiforme.

Tabela 10 - Valores médios da intensidade, percentuais de área marcada e escores obtidos com Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina de CBC excisados por CMM

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

	MARCADORES		
	BER-EP4	MNF116	E-CADERINA
INTENSIDADE (<i>valor médio</i>)			
Esclerodermiforme (n=7)	58,94 (±15,06)	61,29 (± 28,90)	37,60 (±17,79)
Micronodular (n=3)	90,19 (±30,74)	56,81 (± 14,38)	45,35 (±17,30)
PERCENTUAL DE ÁREA MARCADA (<i>valor médio</i>)			
Esclerodermiforme	89,82	90,24	71,84
Micronodular	94,70	93,58	89,52
ESCORE (<i>valor médio</i>)			
Esclerodermiforme	62,39	61,88	33,76
Micronodular	88,92	60,11	50,33

Todas as amostras apresentaram imunomarcção para VEGF mais intensas e evidentes no infiltrado inflamatório perineoplásico (PN) e infrequente no interior das neoplasias, com marcação em mastócitos, linfócitos e células endoteliais de neovasos. A imunomarcção 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 37).

Figura 37 - Aspectos histológicos e imunomarcção para VEGF em amostras de CBC nodular e esclerodermiforme. (a) IHQ VEGF (10X) ausência de imunomarcção na neoplasia e imunomarcção de infiltrado PN. (b) IHQ VEGF (10X) imunomarcção de infiltrado PN e neovasos em CBC esclerodermiforme.

Na análise do VEGF, como descrito previamente, foi realizada a contagem de células por meio do *software* Image J, sendo o resultado expresso em número de células inflamatórias totais e porcentagem de células marcadas pelo anticorpo. A contagem total de células inflamatórias presente ao redor dos tumores mostrou-se semelhante na distribuição entre os tipos histológicos, mas tende a ser menor no CBC micronodular e mais acentuada no CBC esclerodermiforme (Tabela 11).

Tabela 11 - Médias e desvio padrão da contagem do total de células inflamatórias na região peritumoral nos tipos histológicos de CBC

HCFMRP-USP, período de 2011 a 2014

MARCAÇÃO VEGF	MICRONODULAR MÉDIA ($\pm DP$)	ESCLERODERMIFORME MÉDIA ($\pm DP$)
MÉDIA DO TOTAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PERITUMORAIS	2026 ($\pm 1996,3$)	1605,2 ($\pm 846,7$)
PORCENTAGEM DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS MARCADAS COM VEGF (%)	6,4 ($\pm 16,5$)	15 ($\pm 10,7$)

5 DISCUSSÃO

A incidência do CBC vem progressivamente aumentando nas últimas décadas (Jemal et al., 2008). Espera-se 182.000 casos novos de câncer de pele não melanoma na população brasileira em 2015, correspondendo à forma mais incidente de câncer neste país, sendo o CBC responsável por 70% deles, segundo dados do Ministério da Saúde e INCA (INCA, 2014). Apesar da baixa taxa de mortalidade, o CBC gera grande morbidade, uma vez que a maior parte das lesões ocorrem em áreas expostas como cabeça e pescoço, acometendo principalmente a face (Lomas et al. 2012). A cirurgia micrográfica de Mohs, atualmente o padrão ouro para tratamento do CBC, é a forma terapêutica ideal para tratamento dos tumores com alto risco de recorrência ou grande potencial de dano funcional ou estético, resultando nas mais elevadas taxas de cura e conservação máxima do tecido sadio (Rowe et al., 1989).

Em decorrência da relevância epidemiológica do CBC e da cirurgia micrográfica de Mohs como modalidade terapêutica para aqueles de alto risco, buscou-se analisar uma amostra de CBC submetidos à CMM recém implantada em serviço especializado de assistência à saúde de elevada complexidade, em aspectos relacionados às características das neoplasias, à sua indicação e extensão subclínica.

Na amostra, foi observada discreta predominância do sexo feminino (58,4%; 59/101). No entanto, os registros da literatura indicam maior prevalência destes tumores nos homens (Karagas et al., 1999; Chinem e Miot, 2011; Jurciukonyte, 2013). Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que essa proporção vem se alterando, com aumento crescente da neoplasia entre as mulheres (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2006; Lear et al., 2007; Andrade et al., 2012; Asgari et al., 2015). Os fatores aventados para este aumento da incidência seriam condições de igualdade de trabalho, exposição à RUV natural ou artificial como nas câmaras de bronzamento e atividades de lazer e esportivas com maior fotoexposição (Karagas et al., 2002; Chinem; Miot, 2011).

A despeito da idade média mais avançada encontrada na amostra (60,15 anos), condizente com a literatura (Bastiaens et al., 1998; Dreier et al., 2014), nota-se a presença de indivíduos muito jovens, de 24 anos, com o diagnóstico de CBC

que implicou na indicação da CMM. Portanto, a inclusão de pacientes jovens na amostra é concordante com a literatura, que registra o surgimento de CBC em idade mais precoce, principalmente entre os indivíduos do sexo feminino (Flohil et al., 2011), e possivelmente reflete uma tendência da epidemiologia destes tumores.

Ainda, entre os tumores submetidos a CMM, a frequência de tumores primários (50,5%; 51/101) foi algo similar à de tumores recidivados, sendo esta condição um critério de indicação para a CMM. Notou-se que entre os tumores recidivados, todos haviam sido submetidos previamente a cirurgia, cirurgia e radioterapia ou cirurgia e imiquimode.

Na classificação pelo risco histopatológico dos CBC submetidos a CMM houve predomínio significativo do padrão histopatológico de alto risco (69,3%; 70/101), que corresponde aos subtipos esclerodermiforme, infiltrativo, micronodular e metatípico. Já aqueles de baixo risco (nodular e superficial) representaram a minoria dos casos (30,7%; 31/101). Vale ressaltar que os subtipos histológicos considerados de alto risco aumentam as chances de recorrência (Telfer et al., 2008). Além disso, o risco histopatológico é também critério para indicação de CMM, o que justifica este percentual elevado de tumores de alto risco.

É estimado que cerca de um terço dos CBC apresente padrões histopatológicos mistos, com mais de um subtipo na mesma lesão (Sexton et al., 1990). Na amostra do estudo, um percentual superior (46,53%) dos CBC removidos apresentou mais de um subtipo histológico na mesma lesão, sendo possível encontrar três subtipos ou mais em alguns tumores (5,94%). É também relevante o achado da presença subtipos histológicos de baixo e alto risco na mesma lesão em cerca de um terço dos tumores, pois isto pode ser determinante de maior risco de recorrência. A realização de uma biópsia de rotina com punçionador poderia, eventualmente, ser não representativa e classificar o tumor inadequadamente para o seu risco histopatológico. Isto poderia implicar na indicação de métodos terapêuticos não adequados, particularmente se a intenção for indicação de métodos de tratamento sem controle das margens cirúrgicas como por exemplo o imiquimode, terapia fotodinâmica, criocirurgia ou curetagem e eletrocoagulação.

Nossos resultados indicaram que entre os tumores primários e recorrentes houve expressivo predomínio do padrão histológico de alto risco (64,7% e 74%, respectivamente). Tal achado corrobora as elevadas chances de recorrência dos subtipos histopatológicos de alto risco e justifica o elevado número

de tumores primários de alto risco na amostra, pois trata-se de critério de indicação para a CMM.

Entre os critérios que classificam os CBC como de alto risco de recorrência (Telfer et al., 2008) e consequentemente são indicação de CMM, o critério localização é correlacionado ao tamanho do tumor ou potencial dano funcional ou cosmético. No estudo, o critério de localização foi expressivamente preponderante.

Na amostra, todos os CBC eram localizados em áreas fotoexpostas, e apenas 2% localizavam-se fora do segmento cefálico. Vale ressaltar que a região nasal foi expressivamente representada na amostra (52,48%). O predomínio no segmento cefálico, área submetida a exposição solar intensa, está em concordância absoluta com a literatura (Wehner et al., 2015).

Na análise da relação entre a localização dos CBC e o número de fases cirúrgicas, houve correlação entre localização nasal quando comparada a outras áreas e maior número de fases cirúrgicas (duas ou mais fases - $p = 0,04$). Fato também observado para tumores localizados na área H da face ($p = 0,056$), que elevou em quatro vezes as chances da realização de duas ou mais fases. Tais resultados indicam que a localização nasal e na zona H é um dos critérios mais relevantes para a indicação da CMM, em concordância com os resultados de Flohil e colaboradores (2013).

Entre os demais critérios de Rotterdam para indicação de CMM, a delimitação imprecisa e o comprometimento de margens foram aqueles presentes com menor frequência (12,87% e 6,93%, respectivamente). Como explícito anteriormente na descrição dos métodos, os tumores foram avaliados clinicamente e a marcação inicial da neoplasia foi realizada com auxílio da dermatoscopia, como ilustrado na figura 06, com o propósito de aumentar a acurácia da delimitação da neoplasia. Deste modo, o uso da dermatoscopia pode diminuir o número de fases necessárias para sua completa remoção (Caresana; Giardini, 2010). Na prática clínica é crescente o treinamento e uso da dermatoscopia entre dermatologistas, instrumento que além de elevar a acurácia diagnóstica mostrou-se de auxílio na delimitação pré-cirúrgica dos tumores, o que corrobora nossos resultados. Nota-se que a delimitação imprecisa não foi determinante para a realização de maior número de fases.

O critério dimensão esteve representado em cerca de 50% dos tumores. Ressalta-se que o valor médio das lesões foi de 25,3 mm, e 56,4% destas apresentaram 20 mm de diâmetro ou mais no seu maior eixo, critério para indicação da CMM. Vale ressaltar que a análise estatística não mostrou relação entre o tamanho do tumor e o número de fases cirúrgicas, mesmo quando considerados os tumores menores que 20mm ou com 20mm ou mais no seu maior eixo, o que sugere a relevância de outros fatores, e que o manuseio de tumores de grandes dimensões está na dependência da habilidade do cirurgião na remoção em apenas uma fase da CMM, após cuidadosa delimitação de margens.

É ainda pressuposto que a menor frequência de CBC com margens comprometidas representados na amostra possa sugerir que a expressiva maioria das cirurgias realizadas para remoção dos CBC apresentam elevadas taxas de margens livres. Adicionalmente, não houve correlação entre a condição de CBC incompletamente removidos e o número de fases.

Na amostra foi observado que a realização de uma fase cirúrgica foi suficiente para remoção para maioria dos tumores (60,0%), o que pode ser corroborado pela habilidade do reconhecimento das margens clínicas e dermatoscópicas do CBC, e redução do número de fases na CMM. No entanto, pouco menos de um terço dos tumores necessitaram duas fases e o restante (11%) três ou mais fases. Excessivo número de fases (9 fases) foi necessário para aqueles tumores recidivados após radioterapia.

Entre os tumores primários, 70% puderam ser removidos por apenas uma fase cirúrgica. Entre os recidivados um número menor (50%) dos CBC foram removidos com apenas uma fase. A condição de recidiva aumentou significativamente (2,4 vezes) as chances da necessidade de ≥ 2 fases para a sua remoção completa, fato concordante com achados de Flohil e colaboradores (2013) e que valida este critério como relevante para a indicação da CMM. O critério recorrência esteve representado em aproximadamente 50% dos casos na amostra do estudo.

Em relação à análise do número de critérios para a indicação da CMM, por meio da aplicação dos critérios de Rotterdam (Flohil et al. 2013), a maioria dos tumores removidos apresentaram mais de um critério para esta indicação. Ainda, a

presença de maior número de critérios determinou significativamente um maior número de fases ($p = 0,02$ para ≥ 2 fases cirúrgicas) e extensão subclínica do tumor para excisão total do tumor ($p = 0,03$ para 3 ou mais fases cirúrgicas).

Embora tenha sido observada discreta predominância do sexo feminino (58,4%) na nossa amostra, não foram encontradas diferenças entre os sexos quando considerado o número de fases cirúrgicas, ou do risco de extensão subclínica, definida como a realização de três ou mais fases, o que sugere uma homogeneidade dos tumores entre os sexos.

Ainda que na classificação pelo risco histopatológico dos CBC submetidos a CMM tenha ocorrido predomínio significativo do padrão histopatológico de alto risco (69,3%), não houve associação significativa entre os subtipos histológicos e o número de fases cirúrgicas. A maior parte dos tumores possuía pelo menos 2 critérios para indicação de CMM, tornando difícil a comparação entre os riscos histopatológicos isoladamente.

Resta ainda ressaltar que a idade dos pacientes mostrou forte tendência para influir a realização de maior número de fases cirúrgicas ($p=0,06$). O aumento da idade populacional traz consequências intrínsecas de aumento em todos os tipos de cânceres, incluído os de pele. O fator idade também se associou ao maior tempo de evolução dos tumores, portanto é de se esperar tumores maiores em pacientes mais idosos (Chinem e Miot, 2011; Jurciukonyte, 2013).

Na comparação do diâmetro do defeito cirúrgico final e da lesão inicial, houve maior variação percentual (33%) desta diferença entre os tumores recidivados comparados aos primários (29,4%). Notadamente, entre os tumores previamente submetidos à radioterapia, foi observado expressivo valor do aumento desta diferença (143,5%), o que indica grande extensão subclínica. Adicionalmente, foi necessário o dobro do número de fases, chegando a nove fases para remoção dos tumores previamente irradiados (3,5 versus 1,6 para todos os tumores ressecados). Tais achados corroboram o insucesso terapêutico da radioterapia para os CBC e as suas danosas consequências, tais como a extensão subclínica, maior número de fases e amplos defeitos cirúrgicos.

Na amostra, houve elevada frequência para as formas de reconstruções por enxertos ou retalhos comparados ao fechamento primário ($p < 0,001$), indicativo

de maiores dimensões nos defeitos cirúrgicos finais entre os tumores excisados. Como esperado os defeitos maiores impossibilitam, na maioria das vezes, fechamentos primários. A opção pelo fechamento por segunda intenção ocorre raramente, mas é interessante pela maior segurança em relação ao controle das margens.

Na análise do uso de marcadores imuno-histoquímicos no estudo, o anticorpo anti-Ber-EP4 mostrou-se efetivo para marcação dos CBC, em concordância com a literatura (Dasgeb et al., 2013).

Uma análise preliminar qualitativa mostrou ampla marcação na quase totalidade das células dos CBC, com forte intensidade do imunoprecipitado. Um padrão similar pôde ser observado nos diferentes subtipos histológicos compreendidos nas nossas amostras, ou seja, superficial, nodular, micronodular, infiltrativo ou esclerodermiforme. Esta leitura sugeriu que as marcações dos componentes agressivos (esclerodermiforme, infiltrativo e micronodular) eram mais homogêneas e intensas quando comparadas aos de menor agressividade (superficial e nodular), cujas marcações foram mais heterogêneas, mostrando menor intensidade nas áreas centrais e maior na região de paliçada na periferia.

Na análise quantitativa da imunomarcação Ber-Ep4, os valores médios de intensidade e o escore (intensidade x % área marcada) foram superiores nos tumores com componente predominantemente micronodular. Vale notar que mesmo as formas agressivas de CBC não perdem a produção desta proteína, que é de auxílio na diferenciação de outros tumores, como o carcinoma espinocelular (CEC). No entanto, parece não ser útil na diferenciação entre CBC agressivos ou não agressivos (Sellheyer et al., 2013).

O anticorpo anti-MNF116 mostrou marcação semelhante à do anti-Ber-EP4, porém, de forma mais homogênea entre todos os subtipos histológicos. Houve também marcação menos intensa nas regiões centrais dos componentes superficial e nodular e mais intensa na região de paliçada, no entanto com menor contraste quando comparada ao Ber-EP4. Vale observar a epiderme, que também marcada, dificulta a delimitação com os blocos tumorais no CBC superficial (Orchard et al., 2015). Na análise de médias de intensidade de marcação e escores, houve uma inversão em relação ao Ber-EP4, observou-se discreto predomínio de

marcação dos tumores com componente predominantemente esclerodermiforme comparados àqueles com componente micronodular.

A análise da marcação com o anticorpo anti-E-Caderina, de modo geral, mostrou menor intensidade e padrão similar aos demais marcadores. A utilização deste marcador na diferenciação de tumores de mama entre menos e mais agressivos, sendo neste último observada a expressão da E-Caderina, suscitou o interesse desta análise para o CBC, um tumor classicamente pouco metastático e agressivo (Pizarro et al., 1994; Younis et al. 2007).

A análise qualitativa da imunomarcação obtida com todos os marcadores nos diferentes tipos histológicos do CBC compreendidos na amostra do estudo notou-se marcação levemente mais intensa e homogênea nas regiões de paliçada dos componentes superficial e nodular comparados aos componentes esclerodermiforme e micronodular.

Já a análise pelo Image J mostrou média inferior de intensidade de marcação e de escore no CBC esclerodermiforme comparado ao CBC micronodular.

O resumo dos anticorpos empregados no estudo mostrou maior tendência à marcação de anti-Ber-EP4 e anti-E-Caderina nos tumores com componente predominantemente micronodular; e marcação discretamente mais intensa do anti-MNF116 no subtipo esclerodermiforme comparado ao micronodular.

Outra importante observação obtida no estudo: as marcações foram úteis para evidenciar a neoplasia em meio ao processo inflamatório nos tumores cuja inflamação era intensa. Tal fato pode ser observado com os três marcadores, Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina, o que pode consistir em uma ferramenta auxiliar na identificação dos ninhos tumorais nos casos duvidosos na CMM (Sroa et al., 2009).

Os resultados da imunomarcação para VEGF indicaram que em todas as amostras a imunomarcação foi mais intensa e evidente no infiltrado inflamatório perineoplásico (PN) e infrequente no interior das neoplasias. Houve marcação de mastócitos, linfócitos e células endoteliais de neovasos. 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 de escassez do infiltrado inflamatório PN.

6 CONCLUSÕES

Considerando-se a elevada prevalência e morbidade do CBC, são essenciais o reconhecimento de fatores preditivos e auxiliares para a decisão terapêutica, planejamento cirúrgico e para a obtenção das altas taxas de cura por meio da cirurgia micrográfica de Mohs.

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- i) A predominância do sexo feminino na amostra do estudo pode refletir as tendências epidemiológicas, mas não houve diferenças entre os sexos para o aumento das chances da realização de ≥ 2 fases ou ≥ 3 fases;
- ii) Há uma forte tendência da relação entre idade avançada e maior número de fases cirúrgicas para a completa remoção do tumor, o que pode sugerir a presença de tumores mais agressivos pela redução da imunovigilância ou atraso na busca ou acesso ao serviço de saúde especializado;
- iii) A zona H da face e a região nasal são expressivamente representadas entre todas as neoplasias localizadas em áreas fotoexpostas, ambas elevaram significativamente as chances da realização de ≥ 2 fases, o que corrobora este como critério de indicação da CMM, mas não consistiu em risco de extensão subclínica (≥ 3 fases) na amostra do estudo;
- iv) A significativa frequência da coexistência de vários componentes histopatológicos, incluindo aqueles de alto e baixo risco na mesma lesão, indicam a possibilidade de amostras não representativas obtidas por biópsias incisoriais;
- v) Os subtipos histológicos de alto risco predominaram entre os tumores primários e recorrentes com indicação de CMM, mas não mostraram relação com o aumento das chances da realização de ≥ 2 fases ou extensão subclínica (≥ 3 fases) na amostra do estudo;
- vi) Os tumores recorrentes aumentaram significativamente as chances da realização de ≥ 2 fases para a sua remoção completa, o que corrobora

o critério de indicação da CMM, mas não consistiu em critério de extensão subclínica (≥ 3 fases);

- vii) A habilidade da demarcação do tumor e o auxílio da dermatoscopia podem ser os fatores implicados na realização de apenas uma fase para a maioria dos tumores, o que permite menor tempo cirúrgico e maiores taxas de cura;
- viii) Ressalta-se que os tumores previamente irradiados foram aqueles que necessitaram de um número maior de fases cirúrgicas, o que representa maior extensão subclínica, amplos defeitos cirúrgicos finais e reconstruções mais complexas;
- ix) A presença de maior número de critérios foi determinante para a realização de duas ou mais fases e três ou mais fases para a sua excisão total e, conseqüentemente, para a extensão subclínica do tumor;
- x) As marcações por Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina podem ser úteis para evidenciar a neoplasia em meio ao intenso processo inflamatório, em particular se multifocais;

REFERÊNCIAS

Abdelsayed RA, Guijarro-Rojas M, Ibrahim NA, Sanguenza OP. Immunohistochemical evaluation of basal cell carcinoma and trichepithelioma using Bcl-2, Ki67, PCNA and P53. *J Cutan Pathol*. 2000 Apr;27(4):169-75.

Allen SB, Lortscher DN, Sengelmann RD. Earlier detection of patients' second primary basal cell carcinomas: a quantitative analysis. *Dermatol Surg*. 2007 Jan;33(1):69-72.

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.

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.

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.

Arits AH, Mosterd K, Essers BA, Spoorenberg E, Sommer A, De Rooij MJ, van Pelt HP, Quaedvlieg PJ, Krekels GA, van Neer PA, Rijzewijk JJ, van Geest AJ, Steijlen PM, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW. Photodynamic therapy versus topical imiquimode versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2013 Jun;14(7):647-54.

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

Asadi AK, Goldberg LH, Nemeth A, Friedman PM, Jih MH. Mohs micrographic surgery for elliptical excision of skin tumors: a surgical and histological study. *Dermatol Surg* 2004; 30: 1310-18.

Asgari MM, Moffet HH, Ray GT, Quesenberry CP. Trends in Basal Cell Carcinoma Incidence and Identification of High-Risk Subgroups, 1998-2012. *JAMA Dermatol*. 2015 Jun 3.

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.

Basset-Seguin N, Hauschild A, Grob JJ, Kunstfeld R, Dréno B, Mortier L, Ascierto PA, Licitra L, Dutriaux C, Thomas L, Jouary T, Meyer N, Guillot B, Dummer R, Fife K, Ernst DS, Williams S, Fittipaldo A, Xynos I, Hansson J. Vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma (STEVIE): a pre-planned interim analysis of an international, open-label trial. *Lancet Oncol*. 2015 Jun;16(6):729-36.

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.

Berezovsky AB, Rosenberg L, Cagniano E, Silberstein E. The role of frozen section histological analysis in the treatment of head and neck skin basal and squamous cell carcinomas. *IMAJ Isr Med Assoc J* 2008; 10: 344-5.

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.

Boyd AS, Stasko TS, Tang YW. Basaloid squamous cell carcinoma of the skin. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Jan;64(1):144-51.

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.

Brudnik U, Branicki W, Wojas-Pelc A, Kanas P. The contribution of melanocortin 1 receptor gene polymorphisms and the agouti signalling protein gene 8818A>G polymorphism to cutaneous melanoma and basal cell carcinoma in a Polish population. *Exp Dermatol*. 2009 Feb;18(2):167-74.

Caresana G, Giardini R. Dermoscopy-guided surgery in basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010 Dec;24(12):1395-9.

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.

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.

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

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

Bahar Dasgeb, Tarana M Mohammadi, Darius R Mehregan. Use of Ber-EP4 and Epithelial Specific Antigen to Differentiate Clinical Simulators of Basal Cell Carcinoma. *Biomark Cancer*. 2013; 5: 7–11.

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.

Dreier J, Cheng PF, Bogdan Alleman I, Gugger A, Hafner J, Tschopp A, Goldinger SM, Levesque MP, Dummer R. Basal cell carcinomas in a tertiary referral centre: a systematic analysis. *Br J Dermatol*. 2014 Nov;171(5):1066-72.

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

Fan YS, Carr RA, Sanders DS, Smith AP, Lazar AJ, Calonje E. Characteristic Ber-EP4 and EMA expression in sebaceoma is immunohistochemically distinct from basal cell carcinoma. *Histopathology*. 2007 Jul;51(1):80-6.

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

Flohil SC, de Vries E, Neumann HA, Coebergh JW, Nijsten T. Incidence, prevalence and future trends of primary basal cell carcinoma in the Netherlands. *Acta Derm Venereol*. 2011 Jan;91(1):24-30.

Flohil SC, van Dorst AM, Nijsten T, Martino Neumann HA, Munte K. Mohs micrographic surgery for basal cell carcinomas: appropriateness of 'Rotterdam' criteria and predictive factors for three or more stages. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Oct;27(10):1228-35.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991 Apr;113(1):173-85.

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).

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.

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.

Geisse J, Caro I, Lindholm J, Golitz L, Stampone P, Owens M. Imiquimode 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.

Glen MB, George LW, John WG. Mohs micrographic surgery. *Am Fam Phys* 2005; 72: 845-8.

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

Gorlin R. Nevroid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin* 1995; 13: 113-25

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.

Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR, Thorisdottir K, Ragnarsson R, Sveinsdottir SG, Magnusson V, Lindblom A, Kostulas K, Botella-Estrada R, Soriano V, Juberías P, Grasa M, Saez B, Andres R, Scherer D, Rudnai P, Gurzau E, Koppova K, Kiemeny LA, Jakobsdottir M, Steinberg S, Helgason A, Gretarsdottir S, Tucker MA, Mayordomo JI, Nagore E, Kumar R, Hansson J, Olafsson JH, Gulcher J, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet*. 2008 Jul;40(7):886-91.

Han J, Cox DG, Colditz GA, Hunter DJ. The p53 codon 72 polymorphism, sunburns, and risk of skin cancer in US Caucasian women. *Mol Carcinog*. 2006 Sep;45(9):694-700.

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.

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

Humphreys TR, Nemeth A, McCrevey S, Baer SC, Goldberg LH. A pilot study comparing toluidine blue and hematoxylin and eosin staining of basal cell and squamous cell carcinoma during Mohs surgery. *Dermatol Surg* 1996; 22: 693-7.

Instituto Nacional de Câncer - INCA [internet]. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. [Acesso: 08 Ago. 2015]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

Janisson-Dargaud D, Durlach A, Lorenzato M, Grange F, Bernard P, Birembaut P. Aneuploidy, but not Ki-67 or EGFR expression, is associated with recurrences in basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2008 Oct;35(10):916-21.

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

Jih MH, Friedman PM, Goldberg LH, Asadi AK. Curettage prior to Mohs micrographic surgery for previously-biopsied nonmelanoma skin cancer: What are we curetting? A retrospective, prospective and comparative study. *Dermatol Surg* 2005; 31: 10-15.

Julian CG, Bowers PW. A prospective study of Mohs' micrographic surgery in two English centres. *Br J Dermatol*. 1997 Apr;136(4):515-8.

Jimenez FJ, Burchette JL Jr, Grichnik JM, Hitchcock MG. Ber-EP4 immunoreactivity in normal skin and cutaneous neoplasms. *Mod Pathol*. 1995 Oct;8(8):854-8.

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.

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.

Krahl D, Sellheyer K. Monoclonal antibody Ber-EP4 reliably discriminates between microcystic adnexal carcinoma and basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2007 Oct;34(10):782-7.

Kyrgidis A, Tzellos TG, Vahtsevanos K, Triaridis S. New concepts for basal cell carcinoma. Demographic, clinical, histological risk factors, and biomarkers. A systematic review of evidence regarding risk for tumor development, susceptibility for second primary and recurrence. *J Surg Res*. 2010 Mar;159(1):545-56.

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.

Kurokawa I, Takahashi K, Moll I, Moll R. Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders--distribution and clinical significance. *Exp Dermatol*. 2011 Mar;20(3):217-28.

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.

Lallas A, Apalla Z, Argenziano G, Longo C, Moscarella E, Specchio F, Rautucci M, Zalaudek I. The dermatoscopic universe of basal cell carcinoma. *Dermatol Pract Concept*. 2014 Jul 31;4(3):11-24.

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.

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 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.

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.

Magee, A. I., and R. S. Buxton. 1991. Transmembrane molecular assemblies regulated by the greater cadherin family. *Curt. Opm. Cell. Biol.* 3:854-861.

Mallon E, Dawber R. Cryosurgery in the treatment of basal cell carcinoma. Assessment of one and two freeze-thaw cycle schedules. *Dermatol Surg.* 1996 Oct;22(10):854-8.

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.

Mendenhall WM, Ferlito A, Takes RP, Bradford CR, Corry J, Fagan JJ, Rinaldo A, Strojan P, Rodrigo JP. Cutaneous head and neck basal and squamous cell carcinomas with perineural invasion. *Oral Oncol.* 2012 Oct;48(10):918-22.

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

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.

Mleczko A, Franke I, Pokrywka A, Gollnick H, Leverkus M. BerEP4-negative basal cell carcinoma on the palm: case report and review of the literature. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011 Feb;9(2):140-3.

Mohs FE. Micrographic surgery for the microscopically controlled excision of eyelid cancers. *Arch Ophthalmol* 1986; 104 (6): 901-9

Mohs F, Larson P, Iriondo M. Micrographic surgery for the microscopically controlled excision of carcinoma of the external ear. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19 (4): 729-37.

Moldenhauer G, Momburg F, Möller P, Schwartz R, Hämmerling GJ. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer.* 1987 Dec;56(6):714–721.

Mosely H, Mackie RM. Ultraviolet B radiation was increased at ground level in Scotland during a period of ozone depletion. *Br J Dermatol* 1997; 137: 101-2

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

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

National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology: basal cell skin cancers. Version 1.2015. Acesso online em 01 de agosto, 2015, at: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nmsc.pdf.

Neville JA, Welch E, Leffell DJ. Management of nonmelanoma skin cancer in 2007. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007 Aug;4(8):462-9. Review.

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

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.

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.

Orchard GE, Wojcik K, Shams F, Georgaki E, Quaye CJ, Fernando P, Torres J, Ismail F, Shams M. Pan-cytokeratin markers for rapid frozen section immunocytochemistry from head and facial Mohs cases of basal cell carcinoma: a comparison and evaluation to determine the marker of choice. *Br J Biomed Sci*. 2015;72(2):61-6.

Otley CC, Salasche SJ. Mohs surgery: efficient and effective. *Br J Ophthalmol*. 2004 Sep;88(9):1228.

Ramachandran S, Fryer AA, Smith AG, Lear JT, Bowers B, Griffiths CE, Jones PW, Strange RC. Basal cell carcinoma. *Cancer*. 2000 Sep 1;89(5):1012-8.

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

Pelucchi C, Di Landro A, Naldi L, La Vecchia C; Oncology Study Group of the Italian Group for Epidemiologic Research in Dermatology (GISED). Risk factors for histological types and anatomic sites of cutaneous basal-cell carcinoma: an italian case-control study. *J Invest Dermatol.* 2007;127:935-44.

Pizarro A, Benito N, Navarro P, Palacios J, Cano A, Quintanilla M, Contreras F, Gamallo C. E-cadherin expression in basal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 1994 Jan;69(1):157-62.

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

Prieto VG, Lugo J, McNutt NS. Intermediate- and low-molecular-weight keratin detection with the monoclonal antibody MNF116. An immunohistochemical study on 232 paraffin-embedded cutaneous lesions. *J Cutan Pathol.* 1996 Jun;23(3):234-41.

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

Rapini RP. Comparison of methods for checking surgical margins. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 288-94.

Rapini RP. Pitfalls of Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 681-6.

Rapini RP. On the definition of Mohs 1. surgery and how it determines appropriate surgical margins. *Arch Dermatol* 1992; 128: 673-8.

Rasbridge SA, Gillett CE, Sampson SA, Walsh FS, Millis RR. Epithelial (E-) and placental (P-) cadherin cell adhesion molecule expression in breast carcinoma. *J Pathol.* 1993 Feb;169(2):245-50.

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.

Rowe DE, Carrol RJ, Day CL. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient and follow-up. *J Dermatol Surg Oncol* 1989; 15: 315-20 .

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

Schinstine M, Goldman GD. Risk of synchronous and metachronous second nonmelanoma skin cancer when referred for Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Mar;44(3):497-9.

Schulze HJ, Cribier B, Requena L, Reifemberger J, Ferrándiz C, Garcia Diez A, Tebbs V, McRae S. Imiquimode 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled phase III study in Europe. *Br J Dermatol*. 2005 May;152(5):939-47.

Sellheyer K, Nelson P, Kutzner H, Patel RM. The immunohistochemical differential diagnosis of microcystic adnexal carcinoma, desmoplastic trichoepithelioma and morpheaform basal cell carcinoma using BerEP4 and stem cell markers. *J Cutan Pathol*. 2013 Apr;40(4):363-70.

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.

Silapunt S, Peterson SR, Alcalay J, Goldberg LH. Mohs tissue mapping and processing: a survey study. *Dermatol Surg*. 2004 Jun;30(6):961.

Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, Levenstein MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 2: Curettage-electrodesiccation. *J Dermatol Surg Oncol*. 1991 Sep;17(9):720-6.

Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, et al. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas, Part 3: surgical excision. *J Dermatol Surg Oncol* 1992; 18 (6): 471-6.

Situm M, Buljan M, Bulat V, Lugović Mihić L, Bolanca Z, Simić D. The role of UV radiation in the development of basal cell carcinoma. *Coll Antropol*. 2008 Oct;32 Suppl 2:167-70. Review.

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.

Snow SN, Madjar DD Jr. Mohs surgery in the management of cutaneous malignancies. Clin Dermatol 2001; 19: 339-47.

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.

Shriner DL, McCoy DK, Goldberg DJ et al. Mohs micrographic surgery. J Am Acad Dermatol 1998; 39: 79–97.

Sroa N, Campbell S, Ravitskiy L. Immunohistochemistry in Mohs Micrographic Surgery: A Review of the Literature. The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology. 2009;2(7):37-42.

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.

Szeimies RM, Ibbotson S, Murrell DF, Rubel D, Frambach Y, de Berker D, Dummer R, Kerrouche N, Villemagne H; Excilight Study Group. A clinical study comparing methyl aminolevulinate photodynamic therapy and surgery in small superficial basal cell carcinoma (8-20 mm), with a 12-month follow-up. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2008 Nov;22(11):1302-11.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991 Mar 22;251(5000):1451-5. Review.

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.

Tellechea O, Reis JP, Domingues JC, Baptista AP. Monoclonal antibody Ber-EP4 distinguishes basal-cell carcinoma from squamous-cell carcinoma of the skin. *Am J Dermatopathol*. 1993 Oct;15(5):452-5.

Thissen MR, Neumann HA, Schouten LJ. A systematic review of treatment modalities for primary basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 1999; 135: 1177-83.

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

van Iersel CA, van de Velden HV, Kusters CD, Spauwen PH, Blokx WA, Kiemeny LA, Gerritsen MJ. Prognostic factors for a subsequent basal cell carcinoma: implications for follow-up. *Br J Dermatol*. 2005 Nov;153(5):1078-80.

Verhaegh MEJM, Sanders CJG, Arends JW, et al. Expression of the apoptosis-suppressing protein Bcl-2 in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 1995; 132:740-4

Wehner MR, Linos E, Parvataneni R, Stuart SE, Boscardin WJ, Chren MM. Timing of subsequent new tumors in patients who present with basal cell carcinoma or cutaneous squamous cell carcinoma. *JAMA Dermatol*. 2015 Apr;151(4):382-8.

Wilkonkal NM, Berg RJW, van Haselen CW, et al. Bcl-2 vs p53 protein expression and apoptotic rate in human nonmelanoma skin cancers. *Arch Dermatol* 1997; 133: 599-602.

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

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

Yerebakan O, Ciftçioglu MA, Akkaya BK, Yilmaz E. Prognostic value of Ki-67, CD31 and epidermal growth factor receptor expression in basal cell carcinoma. *J Dermatol*. 2003 Jan;30(1):33-41.

Younis LK, El Sakka H, Haque I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. *International Journal of Health Sciences*. 2007;1(1):43-51.

Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, Sotiropoulou PA, Blanpain C. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*. 2010 Mar;12(3):299-305.

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.

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: CIRURGIA MICROGRÁFICA, MICROSCOPIA CONFOCAL E IMUNOISTOQUÍMICA NO CONTROLE DE MARGENS CIRÚRGICAS NOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DO CARCINOMA BASOCELULAR

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: DR. BRUNO DE CARVALHO FANTINI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CACILDA DA SILVA SOUZA;

COLABORADORES: PROF DR. EDSON G. SOARES, DR. ROBERTO BUENO FILHO

O Sr(a). está sendo convidado(a) a participar de estudo sobre câncer da pele, sendo o tipo mais comum, o carcinoma basocelular (CBC) que ocorre principalmente em pessoas de pele clara e intensa exposição ao sol durante a vida. A cirurgia é o principal tratamento para a grande maioria dos casos, e o objetivo do estudo é comparar métodos para o controle das bordas cirúrgicas, com exame microscópico da pele e/ou do tumor já retirado, e saber o que pode ajudar a identificar melhor restos do tumor em algum lugar. Você já foi orientado e concordou com a cirurgia para tratar do seu problema, a escolha do tipo de cirurgia se comum (convencional) ou a cirurgia micrográfica (a retirada do tumor controlada por microscópio durante a cirurgia) já foi indicada e explicada pelo seu médico, assim como as suas possíveis complicações (dor, inchaço, sangramento, tempo de cicatrização e cicatriz), que não diferem entre estes tipos de cirurgia, sendo uma mais rápida e outra mais demorada. No estudo, apenas acrescentaremos alguns exames, que serão realizados antes e/ou depois da cirurgia indicada, e pretendem analisar se sobrou alguma área com tumor.

PROCEDIMENTOS: Se Sr(a). concordar em participar do estudo, será necessária sua autorização para exame com microscópio (microscopia confocal) da sua pele, na área do tumor e ao redor dele para a marcação das margens cirúrgicas. O toque do microscópio na pele não causa dor ou provoca algum ferimento, então dizemos que é exame não invasivo. Depois da retirada do tumor, a peça também será analisada no laboratório com procedimentos especiais.

Os procedimentos (exame com microscópio da área do tumor e da peça retirada) não irão prejudicar, alterar ou atrasar o seu tratamento (cirurgia), seu seguimento médico, ou o resultado do exame. O exame microscópico da pele antes da cirurgia pode retardá-la (15 minutos) e depois parte do tumor removido será examinado no laboratório, além da rotina. Você poderá ser examinado com o microscópio após a cirurgia. Todo material extraído (o tumor) será utilizado apenas para finalidade proposta neste estudo. O uso para outros fins deverá ter novamente a sua permissão. A fotografia do tumor 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, exames que estão sendo feitos na pesquisa, e poderá escolher se quer tomar conhecimento ou não do resultado do estudo.

Data: _____

Dr. Bruno de Carvalho Fantini – Médico pós-graduando do Departamento de Clínica Médica
Hospital das Clínicas-FMRPUSP- Av.: Bandeirantes, 3900 – Mte Alegre Tel.: (16) 36022447

Assinatura: _____

Nome do participante: _____ Registro: _____

Versão modificada 11/03/2013

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

CÓPIA

Ribeirão Preto, 16 de maio de 2013

Ofício nº 1804/2013
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 16819/2012

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"CIRURGIA MICROGRÁFICA, MICROSCOPIA CONFOCAL E IMUNOISTOQUÍMICA NO CONTROLE DE MARGENS CIRÚRGICAS NOS DIFERENTES TIPOS HISTOLÓGICOS DO CARCINOMA BASOCELULAR"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 366ª Reunião Ordinária realizada em 13/05/2013, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão modificada em 11/03/2013.**

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 21/03/2011, 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 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

Ilustríssimos Senhores
BRUNO DE CARVALHO FANTINI
PROFª DRª CACILDA DA SILVA SOUZA (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ARTIGO

Experience of Mohs micrographic surgery group in Hospital das Clínicas – University of São Paulo – Ribeirão Preto medical school (HCFMRP-USP) – Division of Dermatology from 2011 to 2014.

Fantini, BC¹, Filho, RB Filho², Souza, CS³

¹ MD - Division of Dermatology – University of São Paulo, Ribeirão Preto medical school - Division of Dermatology

² MD - Division of Dermatology – University of São Paulo, Ribeirão Preto medical school - Division of Dermatology

³ MD, PhD - Division of Dermatology – University of São Paulo, Ribeirão Preto medical school - Division of Dermatology

INTRODUCTION

Three principles direct the management of all malignancies including basal cell carcinoma (BCC). In order of importance, these are (1) oncologic cure, (2) preservation of function, and (3) restoration of cosmesis. Mohs Micrographic Surgery (MMS) optimizes all of these principles and has become the gold standard for the treatment for nonmelanoma skin cancer (NMSCs) in terms of cure rates, margin control, and tissue conservation. Because of its higher cost and specialized process, MMS is best reserved for specific indications (Gross et al., 1999; Nguyen et al., 2002; Snow et al., 2004; Firnhaber et al., 2012).

Mohs' technique consists on “Horizontal frozen histologic sections” of the excised tumor leading to more complete microscopic examination of the surgical margin than traditional methods (Gross et al., 1999). The same surgeon usually performs the surgery and microscopic examination (Snow et al., 2001). Residual tumor is graphically mapped and malignant extensions are pursued with staged excisions until the tumor is removed. Maximum sparing of tumor-free adjacent tissue is achieved with histologic mapping of the tumor boundaries, thus optimizing subsequent wound reconstruction (Shriner et al., 1998).

Despite the clear benefits of MMS over other treatment modalities, it should not be applied for every BCC. As an example a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up showed that MMS is preferred over surgical excision for the treatment of facial recurrent BCC, on the basis of significantly fewer recurrences after MMS than after surgical excision. However, there was no significant difference in recurrence of primary BCC between treatment groups (Mosterd et al., 2008). Meticulous attention to resection, mapping, and slide preparation and interpretation is characteristic of MMS. The process, therefore consumes time, personnel, and significant resources. To optimize its cost-effectiveness, MMS should be applied only to high-risk BCC, as defined by clinical and histologic features (Randle et al., 1996).

In Brazil MMS was introduced more than 20 years ago (Cernea SS., 1994) and is constantly growing but still underused. It is extremely important to disseminate the technique amongst dermatologic surgeons for the treatment of NMSCs since it can deliver excellent curative and aesthetic results. The purpose of this paper is to correlate clinical and histological features of 101 BCC treated by MMS in the division of dermatology – University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo – Brazil and correlates them with surgical stages.

MATERIALS AND METHODS

We analyzed one hundred and one patients with BCC treated by Mohs micrographic surgery in Hospital das Clínicas – University of São Paulo – Ribeirão Preto medical school (HCFMRP-USP) – division of Dermatology from 2011 to 2014. All patients were diagnosed with BCC and had indication for MMS. Individuals at least 18 years old willing to be treated and with indication of MMS were included. Clinical examination and dermoscopy were used to define the lateral borders of BCC previously to the first surgical stage. Aseptic technique was employed to the surgical intervention. 2% Lidocaine solution was used for regional anesthesia and surgery was performed.

This study is classified as observational, cross-sectional and descriptive. The sample was characterized as convenient, thus justifying the absence of calculation for the minimum sample size.

Data was collected by completion of a protocol previously developed in order to group information that characterizes the clinical, epidemiological and histological profile of the patients. The developed protocol contained a series of information filled in by the doctors on the day of the procedure with the following variables: sex, age, color, histologic subtype, location and size of the tumor, previous treatments to MMS, indication for MMS, number of surgical stages, type of reconstruction and its relations.

It was explained that the patient was absolutely free to participate or not on the study and that confidentiality was guaranteed. All patients previously received an informed consent form.

RESULTS

Medical charts from 101 adult patients submitted to MMS in HCFMRP-USP –Division of Dermatology from 2011 to 2014 were analyzed. No patients were excluded from the analysis.

In terms of sex, 58,4% [59/101] were female and 41,6% [42/101] were male. The average age of the patients was 60,2, varying from 24 to 86 years. Among men, average age was 63,1, varying from 39 to 84; Among women, 58,1, varying from 24 to 86, as seen on Table 1.

Table 1 – Demographic data from patients submitted to MMS in HCFMRP-USP from 2011 to 2014

Group	Male	Female	Total
n (%)	42 (41,6%)	59 (58,4%)	101 (100%)
Age, years (average)	63,1	58,1	60,2
Age, years (variation)	24 – 86	39 – 84	24 - 86

BCC treated by MMS were analysed. Histologic pattern analysis of BCC and its correlation with primary or recurrent condition was performed. Histological classification was performed considering the risk of invasion and recurrence. Six major histologic patterns were identified: micronodular, infiltrative, morpheaform and metatypical BCC – high risk (group A); nodular and superficial – low risk (group B). BCC with a mixed pattern (two or more major histologic patterns) were included into high risk group if a high risk pattern was present (Table2).

Table 2 – Histologic patterns of BCC (n=101) treated by Mohs micrographic surgery in HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Histologic Pattern	Primary n (%)	Recurrent n (%)	Total n(%)
<i>Number of histologic patterns</i>			
One pattern	22 (43,14)	32 (64)	54 (53,5)
Two patterns	27 (52,94)	14 (28)	41 (40,6)
Three or more	02 (03,92)	04 (08)	06 (05,9)
<i>Histologic subtype</i>			
Morpheaform	17 (16,83)	22 (21,78)	<i>High risk (Group A)</i>
Infiltrative	02 (1,98)	03 (2,97)	
Micronodular	10 (9,90)	11 (10,89)	
Metatypical	04 (3,96)	01 (0,99)	
Nodular	15 (14,85)	13 (12,87)	<i>Low risk (Group B)</i>
Superficial	03 (2,97)	00	
Total	51 (50,50)	50 (49,50)	101 (100)

Among treated BCC 70 (69,3%) had a high risk histologic pattern and 31 (30,7%) a low risk as shown in graph 1.

Graph 1 – Distribution of BCCs treated by MMS and histological risk, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Among 101 BCCs submitted to MMS 50 (49,5%) were recurrent (Table 2; Graph 2). 5 (4,95%) of them, more than once. All recurrent BCCs (100%) were previously removed by simple surgical excision; Among them, 4 (8%) were previously treated by surgery and radiotherapy.

Graph 2 – Distribution of BCCs treated by MMS and its condition of primary or recurrent, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

33 (64,7%) of the primary BCC submitted to MMS had a high-risk histological pattern and 18 (35,3%) a low-risk pattern. Among the recurrent BCC, 37 (74%) had a high-risk histological pattern and 13 (26%) a low-risk as observed on graph 3.

Graph 3 – Condition of primary or recurrent and histological pattern of BCC treated by MMS, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

A mixed pattern (two or more major histologic patterns) was present in 47 (46,5%) tumors. In 40,6% (41/101), two patterns; 5,9% (6/101), three or more. In 34 (72,3%) a low risk and high risk pattern could be observed in the same tumor (Graph 4).

Graph 4 – Distribution according to histologic pattern of BCC treated by MMS, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Most tumors (97%) had more than one criteria to be treated by MMS. 3 BCC (2,95%) had one criteria; 23 (22,8%), two; 46 (45,5%), three; 28 (27,7%), four and 1 tumor (0,99%), five criteria. Indication for MMS treatment of BCC was: 92 (91,1%) location (high risk area or with potential functional damage); 72 (73,1%) tumor size correlated to area; 70 (69,3%) histologic pattern; 50 (49,5%) recurrent tumors; 12 (11,9%) were poorly defined and 7 (6,93%) were incompletely excised tumors (Table 3).

Table 3 - Criteria for MMS (n=101), HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Indication for MMS	Number of tumors	Percentage (%)
Location	92	91,1
Agressive histologic pattern	70	69,3
Recurrence	50	49,5
Size	72	73,1
Poorly defined	12	11,9
Incompletely excised	7	6,9

The number of criteria was associated to the number of surgical stages (Graph 5). Tumors with two or more and three or more stages had a superior number of criteria for MMS (Mann-Whitney test; $p = 0,02$ e $p = 0,03$).

Graph 5 – Number of criteria correlated to surgical stages of BCC treated by MMS, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Topographic distribution of treated BCCs showed a predominance on the sun-exposed areas of the head. Most of BCCs were located on the nose 53 (52,48%), followed by periorbital region 15 (14,85%). Nasolabial fold was affected in 6 (5,94%) patients, Lips in 5 (4,95%), cheeks in 5 (4,95%), temple in 5 (4,95%), ears in 4 (3,96%), scalp in 3 (2,97%), forehead in 3 (2,97), pretibial region in 1 (0,99%) and trunk in 1 (0,99%). (Graph 6)

Graph 6 – Topography of BCCs treated by MMS, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Measurement of tumors maximum diameter ranged from 4 mm to 120 mm (average = 25,3 mm). 57 (56,4%) BCCs had 20 mm or more at its largest diameter.

40 (39,6%) tumors needed two or more surgical stages to be completely removed. 61 (60,40%) were removed by one stage; 29 (28,71%) by two stages and 11 (10,89%) needed 3 or more stages. Number of stages ranged from 1 to 9. Table 4 correlates the number of stages with recurrence and histologic risk of the treated BCCs.

Table 4 – Distribution of treated BCC histologic risk and number of surgical stages, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Surgical stages	1 n (%)	2 n (%)	3 or more n (%)
All tumors	61 (60,4)	29 (28,71)	11 (10,89)
Primary	36 (70,6)	11 (21,56)	4 (7,84)
Recurrent	25 (50)	18 (36)	07 (14)
High-risk histology	42 (60)	20 (28,57)	08 (11,43)
Low-risk histology	19 (61,3)	09 (29,03)	3 (9,67)
Predominantly high-risk histologic pattern	29 (56,87)	17 (33,33)	5 (9,80)
Predominantly low-risk histologic pattern	32 (64%)	12 (24)	6 (12)

70,59% (36/51) of the primary BCC removed needed only one surgical stage. In the recurrent group, 50% (25/50) needed one stage. Graph 7 correlates the number of surgical stages and condition of primary or recurrent.

Graph 7 - Number of surgical stages and condition of primary or recurrent BCC, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Regarding the number of surgical stages and condition of primary or recurrent BCC, the second condition significantly increased the need for two or more stages for its complete removal [OR = 2.40, 95% CI 1.06 to 5.44; Chi-squared test (X^2) = 4.47, p = 0.03], but did not increase the chance of achieving 3 or more stages (X^2 = 0.99 p = 0.35; OR 1.91; 95% CI = 0, 52 - 6.99).

Considering the age of the individuals and surgical stages, comparing numerical variables, using independent-samples t test, there was a strong tendency for individuals with higher age undergoing more surgical stages (p = 0.06) as can be observed on graph 8.

Graph 8 - Number of surgical stages and age of the individuals treated by MMS, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

There was no difference between gender when considering the number of surgical stages, one stage versus two or more (X^2 = 1.93; p = 0.17; OR = 1.77, 95% CI 0.79 to 3.99), or risk of subclinical extension, defined as three or more stages (X^2 exact test p = 0.19; OR = 2.75; 95% CI 0.75 to 10.09).

There was no difference in the number of surgical stages among histological subtypes (micronodular, infiltrative, morpheaform, metatypical, nodular and superficial) for 2 or more or three or more stages. (X^2 exact test $p = 0.74$ and $p = 0.68$ respectively). There was also no difference when comparing high and low risk groups: 1 versus ≥ 2 stages (X^2 test = 0.02 $p = 0.92$; OR = 0.95 95% CI 0.40 to 2.25); 1 or 2 stages versus ≥ 3 (X^2 exact test, $p = 1.00$; OR = 0.83 95% CI 0.21 to 3.37).

Regarding the affected area, among tumors located on the nose, the frequency of ≥ 2 stages versus one stage was significantly higher when compared to other regions (X^2 exact test, $p = 0.04$; 67.5% vs 42.6%).

Considering the high risk “Mask area of face”, compared to other regions, BCC located in this area had 4.1 times more chance of two or more surgical stages compared to other regions ($X^2 = 3.66$, $p = 0.056$; OR = 4.18, 95% CI 0.87 to 20.00), as seen in graph 9.

Graph 9 – Number of surgical stages and affected area, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Correlating final surgical defect with initial surgical margins we have observed an average increase of 31,49% in largest diameter of the defect . 29,44% for primary tumors and 33% for recurrent BCCs. (Graph 10).

Graph 10 – Postoperative defect size percentage increase correlated to the condition of primary or recurrent BCC, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Correlating surgical stages and tumor size it was observed that 45,6% (26/57) BCCs larger than 2 cm across needed two or more surgical stages, while 31,8% (14/44) BCCs less than 2 centimeters needed 2 or more surgical stages as can be observed on graph 11. Only 4,5% (2/44) BCCs smaller than 2 cm needed 3 surgical stages or more. 15,8% (9/57) BCCs larger than 2 cm across needed 3 stages or more. However, statistically, tumors ≥ 20 mm were not associated with 2 or more surgical stages (47.5% vs. 52.5%; $X^2 = 0.24$, $p = 0.63$, OR = 1.22 95% CI 0, 55 - 2.71); or three or more surgical stages ($X^2 = 0.99$ $p = 0.32$, OR = 1.91, 95% CI 0.52 to 6.99).

Graph 11 – Correlation between number of stages (2 or more) and tumor size of BCCs treated by MMS, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Among BCC with poorly defined margins ($n = 12$; 11.9%), there were no significant difference in the frequency of one versus 2 or more surgical stages (X^2 exact test $p = 0.53$ OR = 1.62 95% CI 0.48 to 5.42); or one or two versus three surgical stages (X^2 exact test $p = 0.12$ OR = 3.38 95% CI 0.76 to 15.05).

For those tumors incompletely removed and submitted to MMS, there was also no differences in the frequency of one versus two or more surgical stages (X^2 exact test $p = 0.70$ OR = 0.59 95% CI 0.11 to 3.20) ; or one or two versus three surgical stages (X^2 exact test $p = 0.60$).

Of 101 treated BCCs, 4 have been previously submitted to radiotherapy. The average number of surgical stages necessary to remove these BCCs was 3,5. The average number of stages to remove all treated tumors was 1,6 as can be observed on graph 12. Correlating final surgical defect with irradiation it was observed among irradiated tumors an increase of 143,5% in largest diameter of the defect when compared to initial size. The average increase considering all tumors was 31,49%. (variation of largest diameter was 4,95cm among irradiated BCCs and 0,79cm among all tumors treated by MMS) Graph 13.

All previously irradiated tumors showed a morpheaform histologic pattern. There was association with micronodular component on 2 of them.

Graph 12 – Correlation between number of stages and irradiation of BCCs treated by MMS, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

Graph 13 – Variation in final defect size and its correlation with irradiation, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

After surgical treatment 30 (29,7%) patients underwent reconstruction by flaps isolated; 31 (30,7%) by grafts; 25 (24,75%) by primary wound closure; 4 (3,96%) healed by second intention; 7 (6,93%) by flaps and grafts associated and 4 (3,96%) by primary wound closure and graft association as can be observed on graph 14.

Graph 14 – Distribution of treated BCCs related to wound reconstruction, HCFMRP-USP, from 2011 to 2014

DISCUSSION

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common type of non-melanoma skin cancer and the most frequently occurring form of all cancers in caucasian. BCC most often occurs on sun-exposed areas and frequently appears on the face. Despite low mortality rate, it generates high morbidity. Some factors such as size, histological subtype, location, recurrence, poor delimitation and others are predictors of recurrence. Mohs micrographic surgery (MMS) is the gold-standard treatment for high-risk BCC. It has the highest cure rates and causes less damage to healthy tissue than other options. In addition, it allows the assessment subclinical extent of BCC, correlated to the number of surgical stages. Considering that MMS provides the highest cure rates for BCC, we analyzed the characteristics of

individuals and different clinical and histological types of BCC treated by MMS and factors related with subclinical extension.

The study sample, in terms of sex, showed female predominance, 58,4% [59/101]. Although average age was 60,15 there were young individuals, aged 24, and with indication for MMS.

Among patients with BCCs treated by MMS, there was a slight predominance of primary tumors (n=51; 50,5%) and those classified as having a high-risk histological pattern (n=70; 69,3%) (morpheaform, infiltrative, micronodular and metatypical). The number of recurrent tumors was representative (n=50; 49,5%) in the sample studied, most of them had one histological subtype (n=32; 64%). Among primary tumors, most had two or more patterns (n=29; 56,86%). It is important to note that 72,3% (n=34) of the tumors with more than one pattern had a low and high risk subtype in the same lesion, what should be considered in the risk analysis for the first treatment approach.

In the histological subtype analysis, morpheaform subtype prevailed between primary BCCs (n=17; 33,3%) and recurrent tumors (n=22; 44%), followed by nodular subtype (respectively n=15; 29,4% and n=13; 26%). As the results show, among recurrent BCCs with indication for MMS, nodular histologic subtype, considered a low-risk subtype, is representative.

Analysis of the relationship between primary tumors, recurrent tumors and the dominant histological pattern showed that the frequency of low histological risk (n = 32; 62.75%) predominated among the primary tumors when compared to the high histological risk (n = 19; 37, 25%). There is an inversion of results between recurrent tumors, the majority (n = 32; 64%) had high histological risk and a lower percentage (n = 18; 36%) low histological risk.

Regarding the number of surgical stages, most BCCs needed one stage to be completely removed (n=61; 60,40%), but an expressive number of tumors (n=40; 39,60%) required two or more stages for its complete removal.

Correlating the number of surgical stages and condition of primary or recurrent BCC, the second condition significantly increased the need for two or more stages for its complete removal [OR = 2.40, 95% CI 1.06 to 5.44; Chi-squared test (X^2) = 4.47, p = 0.03].

Age was also correlated to the number of surgical stages. Comparing numerical variables, using independent-samples t test, there was a strong tendency for individuals with higher age undergoing more surgical stages (p = 0.06).

Most tumors (97%) had more than one criteria to be treated by MMS and the number of criteria was also associated to the number of surgical stages (Mann-Whitney test; p = 0,02).

Most BCCs were located on the head. The nose was the most common location (52,48%), followed by periorbital region (14,85%). The frequency of two stages or more versus one stage was significantly higher among tumors located in the nose and high risk "Mask area of face" when compared to other regions (X^2 exact test, $p = 0.04$; 67.5% vs 42.6% and $X^2 = 3.66$, $p = 0.056$; OR = 4.18, 95% CI 0.87 to 20.00). This result may suggest that BCCs located in the nasal region and high risk "Mask area of face" should have an early indication for MMS as the first treatment approach.

Most treated tumors were 20 mm or more at its largest diameter ($n=57$; 56,4%).

BCCs previously submitted to radiation therapy needed more surgical stages to be removed (3,5 stages, compared to 1,6 considering all treated BCCs). Correlating final surgical defect with irradiation it was observed among irradiated tumors an increase of 143,5% in largest diameter of the defect when compared to initial size. The average increase considering all tumors was 31,49%. It suggests that radiation therapy may increase the complexity of MMS.

After MMS, several surgical reconstruction modalities for the defect were implemented and sometimes combined. Most of the patients 31 (30,7%) underwent reconstruction by graft isolated; 30 (29,7%) by flap isolated; 25 (24,75%) by primary intention healing; 4 (3,96%) healed by second intention; 7 (6,93%) by flap and graft associated and 4 (3,96%) by primary wound closure and graft association.

Considering the high prevalence of the tumor and its morbidity, recognition of predictive and auxiliary factors in therapeutic decisions are crucial in surgical planning and effectiveness of the chosen treatment.

The results of this study support the conclusion that the decisive criteria for MMS indication, defined as two or more surgical stages to completion were: tumors located in the nose and high-risk "mask-area of the face", recurrent tumors and association of several criteria for MMS. Previously irradiated tumors needed more surgical stages and resulted in bigger final surgical defects, suggesting a greater subclinical extension.

REFERENCES

Cernea SS. Experiência do grupo de cirurgia micrográfica de Mohs do HCFMUSP: dezembro/1989 a abril/1993. *An Bras Dermatol*. 1994;69:365-73.

Firnhaber JM. Diagnosis and treatment of Basal cell and squamous cell carcinoma. *Am Fam Physician*. 2012 Jul 15;86(2):161-8. Review.

Gross KG, Steinman HK, Rapini RP. Mohs surgery: fundamentals and techniques. St Louis: Mosby; 1999. 369 p.

Mosterd K, Krekels GA, Nieman FH, Ostertag JU, Essers BA, Dirksen CD, Steijlen PM, Vermeulen A, Neumann H, Kelleners-Smeets NW. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for primary and recurrent basal-cell carcinoma of the face: a prospective randomised controlled trial with 5-years' follow-up. *Lancet Oncol*. 2008 Dec;9(12):1149-56.

Nguyen TH, Ho DQ. Nonmelanoma skin cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2002 Jun;3(3):193-203. Review.

Randle HW. Basal cell carcinoma. Identification and treatment of the high-risk patient. *Dermatol Surg*. 1996 Mar;22(3):255-61. Review.

Shriner DL, McCoy DK, Goldberg DJ, Wagner RF Jr. Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol*. 1998 Jul;39(1):79-97. Review.

Snow SN, Madjar DD Jr. Mohs surgery in the management of cutaneous malignancies. *Clin Dermatol*. 2001 May-Jun;19(3):339-47. Review.

Snow, Stephen N; Mikhail, George R. Mohs micrographic surgery 2nd ed. Madison, Wis. : University of Wisconsin Press, c2004. NLM ID: 101218864 [Book]