UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Roberto Bueno Filho

Marcadores Preditivos do Comprometimento das Margens Cirúrgicas do Carcinoma Basocelular

Ribeirão Preto 2015

ROBERTO BUENO FILHO

Marcadores Preditivos do Comprometimento das Margens Cirúrgicas do Carcinoma Basocelular

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica

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.

Bueno Filho, Roberto

Marcadores preditivos do comprometimento das margens cirúrgicas do carcinoma basocelular. Ribeirão Preto, 2015.

155 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. Predição
- 4. Recidiva. 5. Grupos de Risco 6. Imuno-histoquímica.

Bueno Filho R. Marcadores preditivos do comprometimento das margens cirúrgicas do carcinoma basocelular. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Λ.			
$^{\prime\prime}$	$r \cap V \cap C$	Δ	am.
\neg v	IUVC	นบ	em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza – FMRP-USP
Assinatura:
Prof. Dr. Fernando Chahud – FMRP-USP
Assinatura:
Prof. Dr. Fernanda Maris Peria – FMRP-USP
Assinatura:
Profa. Dra. Mírian Nacagami Sotto – FMUSP
Assinatura:
Prof. Dr. Antônio Carlos Martins Guedes - UFMG
Assinatura:

DEDICATÓRIA

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

A minha irmã Marília Bueno e a todos da minha família, que me apoiaram e me estimularam desde que ingressei no doutorado até sua conclusão;

A minha esposa, Leticia, companheira, amiga, por compartilhar do mesmo momento com seu doutorado e mesmo assim me ajudar e apoiar nos momentos difíceis. Estar ao seu lado fez toda diferença.

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

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Fernando Chahud, por me acolher em seu laboratório e pela da oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao Abel Dorigan Neto, pela amizade e por tornar realidade a cirurgia micrográfica de Mohs, junto com toda equipe do laboratório de Patologia do HCRP, onde todas as quinta-feiras me acolhem com toda amizade e carinho durante as cirurgias mais importantes que realizo.

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, além da amizade que fizemos nesse processo.

À Mônica Abreu, do laboratório de Patologia do HCRP, pela contribuição no desenvolvimento da técnica de imuno-histoquímica, permitindo a realização desse projeto.

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

Aos alunos de graduação de Medicina da FMRP-USP, Rafael Gontijo, Isadora Rosan e Cecília Anatriello, pela contribuição na coleta de dados dos casos de carcinoma basocelular do ano de 2011.

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 e Patologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pela colaboração constante.

Aos pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pois sem eles não seria possível este estudo.

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

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

"Ame a Dermatologia, faça dela uma das razões de sua vida e terá sempre uma razão para viver."

Sebastião Sampaio (1919 -2008)

RESUMO

Bueno Filho, R. Marcadores preditivos do comprometimento das margens cirúrgicas do Carcinoma Basocelular. [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2015. 155 f.

O carcinoma basocelular (CBC) é malignidade de incidência elevada e crescente na população caucasiana, e sua expressiva prevalência nos serviços de saúde remete à necessidade de avaliação dos índices de cura. O presente estudo analisou marcadores clínicos preditivos do comprometimento das margens cirúrgicas do CBC, em conjunto com um painel de marcadores imuno-histoguímicos (IHQ). Analisou-se 1294 laudos histopatológicos de CBC, emitidos durante 2011, e incluídos 674 casos de excisão cirúrgica completa realizada por diferentes especialidades em hospital terciário. Foram selecionados 40 casos dos diferentes subtipos histológicos para realização de IHQ para os marcadores Ber-EP4, MNF116, E-Caderina e VEGF, analisados por sistema digital de captação de imagens e programa de computador. Na amostra, houve predomínio de homens (60,4%) com idade média de 68 anos, da localização cefálica (71%) e do subtipo nodular (61%); da ulceração (p= 0,003) e do diâmetro médio superior dos CBC nos homens (307,41 mm² x 190,74 mm²; p< 0,001); do subtipo superficial de localização no tronco (p< 0,001) e em mais jovens (<73 anos; p= 0,001); do subtipo nodular (p< 0,001) e ulcerado (p= 0.05) no segmento cefálico. A especialidade Dermatologia foi responsável pela maioria das cirurgias (78%), cuja dimensão média e índice de margens cirúrgicas livres dos CBC excisados foram respectivamente 274 mm² e 95%, seguida por 279 mm² e 89% na Cirurgia Plástica, 218 mm² e 60% na Cirurgia de Cabeça e Pescoço (CCP), 87 mm² e 49% na Oftalmologia. O risco para desfecho em margens cirúrgicas comprometidas foi determinado para: subtipo micronodular (OR 3,41; IC 95% 1,71 – 6,80; p=0.001); localização cefálica (OR 8.33 IC 95% 1.05 – 50; p=0.045); excisões realizadas pelas especialidades Oftalmologia (OR 10,12; IC 95% 4,40 - 23,27; p= 0,001) e CCP (OR 9,67; IC 95% 5,14 – 18,21; p= 0,001). A imunomarcação pelo Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina foi homogênea e de intensidade moderada a acentuada nas células neoplásicas em todos os subtipos; os valores de intensidade da marcação, percentual de área e escore para o MNF116 discriminaram os CBC agressivos (esclerodermiforme e micronodular) daqueles não agressivos (nodular e superficial); e foram superiores para E-Caderina no subtipo superficial; o percentual de células marcadas pelo VEGF foi superior nos tumores agressivos (p< 0.001). O segmento cefálico e o subtipo micronodular. seguido do esclerodermiforme, implicam em riscos elevados para o comprometimento das margens e merecem atenção quanto ao manuseio cirúrgico. A imunomarcação por Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina pode auxiliar na identificação de ninhos tumorais multifocais no subtipo superficial, ou em meio ao processo inflamatório nos subtipos agressivos. A marcação da E-Caderina pode representar o padrão menos agressivo e de crescimento radial do subtipo superficial; e a do VEGF, nos tumores mais agressivos, ser indicativa do papel desta proteína no comportamento mais invasivo. A especialidade Dermatologia tem expressiva participação institucional e níveis de resolubilidade superiores, representada pelas maiores frequências de excisão de CBC e de margens cirúrgicas livres. O reconhecimento de fatores preditivos para desfecho em margens cirúrgicas comprometidas é de fundamental relevância para o planejamento cirúrgico e obtenção das mais elevadas taxas de cura.

Palavras-chave: Carcinoma basocelular. Neoplasia Residual. Predição. Recidiva. Grupos de Risco. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Bueno Filho, R. Predictive markers of surgical margins commitment in basal cell carcinoma. [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2015. 155 p.

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common human malignancy and it is increasing its incidence in the Caucasian population. The significant prevalence of cases in specialized health services indicates the need of assessment of cure rates. The present study analyzed clinical predictive markers of compromised surgical margins in BCC in association with a panel of Immunohistochemistry (IHC) markers. We analyzed 1294 BCC histopathological reports during 2011, and 674 cases of complete surgical excision performed by different specialties in a tertiary hospital were included. From the sample, 40 cases of different histological subtypes were selected to perform IHC markers Ber-EP4. MNF116, E-cadherin and VEGF, which were analyzed by digital image capture system and computer program. There was male predominance (60.4%) with mean age of 68 years, location at cephalic segment (71%) and nodular subtype (61%); ulceration (p= 0.003) and higher average size of CBC in men (307.41 mm² x 190.74 mm²; p< 0.001); superficial subtype was more frequent on trunk (p< 0.001) and in younger than 73 years (p< 0.001); nodular subtype (p< 0.001) and ulceration (p= 0.05) at cephalic segment. The specialty Dermatology performed the majority of surgeries (78%), and the average size and the index of free surgical margins were 274 mm² and 95% in Dermatology, 279 mm² and 89% in Plastic Surgery, 218 mm² and 60% in Head and Neck Surgery (HNS), 87 mm² and 49% in Ophthalmology. The risk for compromised surgical margins was determined for: micronodular subtype (OR 3.41; 95% CI 1.71 – 6.80; p= 0.001); location at cephalic segment (OR 8.33; 95% CI 1.05 – 50; p= 0.045); excisions performed by Ophthalmology (OR 10.12; 95% CI 4.40 - 23.27; p= 0.001) and HNS (OR 9.67; 95% CI 5.14-18.21; p= 0.001). Immunostaining by Ber-EP4, MNF116 and E-cadherin was homogeneous and moderate to high intensity within the neoplastic cells in all BCC subtypes; values obtained from staining intensity, percentage of area and score for the MNF116 showed difference between aggressive BCC (morpheaform and micronodular) and non-aggressive (superficial nodular); and were higher for E-cadherin in superficial BCC; the percentage of marked cells by VEGF was higher in aggressive tumors (p< 0.001). The cephalic segment and micronodular subtype, followed by the morpheaform, imply high risks for compromised margins and deserve attention during the surgical treatment by trained experts. The immunohistochemistry markers Ber-EP4, MNF116 and E-cadherin may help the identification of multifocal tumor nests in superficial subtype or amid the inflammatory process in the aggressive subtypes. E-cadherin staining may represent the least aggressive and radial pattern of growth of superficial subtype. VEGF staining in peritumoral inflammatory cells of aggressive tumors may be indicative of the role of this protein in more invasive behavior of these subtypes of the BCC. Dermatology has significant institutional participation with highest resolution, represented by higher frequency of BCC excision and less compromised surgical margins. Knowing the predictive factors for compromised surgical margins is important for planning surgical treatment and obtaining the highest cure rates.

Key words: Basal Cell Carcinoma. Residual Neoplasia. Prediction. Relapse. Risk groups. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspectos clínicos do CBC26
Figura 2 -	Aspecto clínico do CBC nodular e pigmentado – Diagnóstico Dermatoscópico
Figura 3 -	Aspectos histológicos dos diferentes subtipos de CBC31
Figura 4 -	Algoritmo para tratamento do CBC33
Figura 5 -	Delimitação da área imunomarcada através da seleção automática no programa Image J55
Figura 6 -	Eliminação do fundo para análise em 8-bit da área imunomarcada na escala de cinza
Figura 7 -	Determinação de porcentagem de área imunomarcada pelos anticorpos através de limiar de detecção (threshold – máximo da escala de cinza de 127)
Figura 8 -	Fórmula para transformação de escala de cinza em intensidade de marcação
Figura 9 -	Exemplo de contagem de células imunomarcadas com anticorpo anti- VEGF, mostrando em amarelo células inflamatórias negativas e em vermelho as células positivas para VEGF
Figura 10 -	Aspectos histológicos e imunomarcação para Ber-EP4, MNF 116 e E-Caderina em CBC nodular80
Figura 11 -	Aspectos histológicos e imunomarcação para Ber-EP4, MNF 116 e E-Caderina em CBC superficial81
Figura 12 -	Aspectos histológicos e imunomarcação para Ber-EP4, MNF 116 e E-Caderina em CBC esclerodermiforme82
Figura 13 -	Aspectos histológicos e imunomarcação para Ber-EP4, MNF 116 e E-Caderina em CBC micronodular83
Figura 14 -	Aspectos da imunomarcação para VEGF em CBC esclerodermiforme e micronodular
Figura 15 -	Aspectos histológicos e imunomarcação para Ber-EP4 e MNF 116 em CBC esclerodermiforme

Figura 16 -	Análise no software Image marcação e porcetual de cé		
Figura 17 -	Análise no software Image marcação e porcetual de cé		
Figura 18 -	Análise no software Image marcação e porcetual de cé	•	
Figura 19 -	Análise no software Image marcação e porcetual de cé		

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fatores que influenciam o prognóstico do CBC28
Tabela 2 -	Indicações da cirurgia micrográfica de Mohs35
Tabela 3 -	Relação dos anticorpos primários54
Tabela 4	- Distribuição segundo sexo e especialidade responsável pela cirurgia de casos de CBC (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011
Tabela 5 -	Distribuição segundo idade categorizada e especialidade responsável pela cirurgia de casos de CBC (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011
Tabela 6 -	Frequência da ulceração em CBC excisados (n= 674) entre as especialidades responsáveis pela cirurgia no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011
Tabela 7 -	Distribuição segundo tipo histológico e a especialidade responsável pela cirurgia CBC (n=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011
Tabela 8 -	Distribuição segundo dimensão de casos de CBC excisados (n= 674) e a especialidade responsável pela cirurgia no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011
Tabela 9 -	Distribuição segundo sexo e localização de casos de CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011
Tabela 10	-Distribuição segundo sexo e presença de ulceração nos CBC excisados (n=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 201170
Tabela 11	-Distribuição segundo sexo do paciente e tamanho dos CBC excisados (n=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 201171
Tabela 12	-Distribuição segundo idade categorizada e localização dos CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 201172
Tabela 13	-Distribuição segundo presença da ulceração e localização dos CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 201172

ex	Pistribuição segundo o tipo histológico e a localização xcisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a de 2011	lezembro
(n:	Distribuição segundo tamanho e localização de CBC en=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezer	mbro de
ex	Distribuição segundo idade categorizada e ulceração d xcisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a d e 2011	lezembro
CE	Distribuição segundo tipo histológico e presença de ulcera CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de j ezembro de 2011	janeiro a
ра	Distribuição segundo tipo histológico e idade categoriza acientes com CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, po aneiro a dezembro de 2011	eríodo de
CE	nálise do risco para desfecho com margens compromet BC excisados (n= 674) por diferentes especialidades no H ISP, período de janeiro a dezembro de 2011	ICFMRP-
es	alores médios da intensidade, percentuais de área ma scores obtidos com Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina nos d ubtipos histológicos do CBC	liferentes
inf reç ag	abela de médias e desvio padrão da contagem do total de filamatórias e da porcentagem de células marcadas com vegião peri-tumoral nos tipos histológicos de CBC e nos grugressivo (nodular e superficial) e agressivo (esclerodermicronodular)	/EGF na upos não iiforme e

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Gráficos da análise descritiva63
Gráfico 2 -	Relação entre dimensão dos tumores excisados (n= 674) e índice de margens livres, em acordo com a especialidade responsável pelo procedimento no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011
Gráfico 3 -	Relação entre idade e margens cirúrgicas livres ou comprometidas de CBC excisados (n= 674)65
Gráfico 4 -	Relação entre sexo e presença de ulceração tumoral no CBC (n= 674), período de janeiro a dezembro de 201170
Gráfico 5 -	Relação entre sexo e tamanho médio dos tumores no CBC (n= 674), período de janeiro a dezembro de 201171
Gráfico 6 -	- Relação entre idade categorizada (73 anos) e presença de ulceração tumoral no CBC (n= 674), período de janeiro a dezembro de 201174
Gráfico 7 -	Comparação marcação imuno-histoquímica por Ber-EP4 nos subtipos do carcinoma basocelular91
Gráfico 8 -	Comparação marcação imuno-histoquímica por MNF116 nos subtipos do carcinoma basocelular93
Gráfico 9	- Comparação marcação imuno-histoquímica por E-Caderina nos subtipos do carcinoma basocelular95
Gráfico 10	- Gráficos <i>box-plot</i> da contagem de células inflamatórias peritumorais e da porcentagem de imuno-marcação de VEGF98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU 5 – Fluorouracil

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC Célula apresentadora de antígeno

ASIP Proteína sinalizadora agouti

BCC Basal cell carcinoma

Bcl-2 célula do linfoma B 2 (*B cell lymphoma 2*)

Ber-EP4 Antígeno epitelial humano

BSA Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

CBC Carcinoma basocelular

CEC Carcinoma espinocelular

CQ Citoqueratina

CTLA-4 Antígeno 4 do linfócito T citotóxico

DAB Diaminobenzidina

DJT Derme justatumoral

DNA Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

DP Desvio padrão

E-CD E-Caderina

ed. Edição

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

et al. E outros

FDA Food and Drug Administration

GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GSTP1 Glutationa S-transferase P1

HCRP Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de

Ribeirão Preto

HE Hematoxilina-eosina

IFN Interferon

IHQ Imuno-histoquímica

IL Interleucina

INCA Instituto Nacional de Câncer

MC1R Melanocortina 1

MNF116 Citoqueratina humana

MSH Hormônio estimulador do melanócito

NK Células T Natural Killers

PBS Solução salina (phosphate buffered saline)

PCR Reação em cadeia da polimerase

PTCH Gene humano homólogo da *Drosophila*

RNA Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RUV Radiação ultravioleta

SERPAT Serviço de Patologia

Th linfócitos T auxiliares (T helper)

TNF Fator de necrose tumoral

Treg Célula T regulatória

TSP-1 Trombospondina-1

TYR Tirosinase

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/I milimolar por litro

n° número

nm nanômetro

μl microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Carcinoma Basocelular	22
1.1.1 Epidemiologia e etiopatogenia	22
1.1.2 Manifestações clínicas	. 24
1.1.3 Diagnóstico e prognóstico	27
1.1.4 Histopatologia	. 28
1.1.5 Opções terapêuticas	31
1.1.5.1 Cirurgia convencional	. 33
1.1.5.2 Cirurgia micrográfica de Mohs	. 34
1.1.5.3 Curetagem e eletrocoagulação e criocirurgia	. 35
1.1.5.4 Métodos imunológicos e terapias sistêmicas	36
1.1.5.5 Terapia fotodinâmica e radioterapia	. 37
1.2 Fatores de risco no Carcinoma Basocelular	. 38
1.2.1 Fatores Preditores de Incidência do Carcinoma Basocelular	39
1.2.2 Fatores Preditores de Desenvolvimento de Múltiplos CBC	. 40
1.2.3 Fatores Preditores de Recorrência do CBC	. 40
1.3 Marcadores Biológicos	41
1.3.1 Antígeno Epitelial (Clone Ber-EP4)	42
1.3.2 Citoqueratina Humana (Clone MNF116)	. 44
1.3.3 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	. 45
1.3.4 Proteína transmembrana de adesão cálcio-dependente de epitélio (E-	
Caderina)	. 46
2 OBJETIVOS	. 49
2.1 Objetivo geral	. 49
2.2 Objetivos específicos	. 49
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	. 51
3.1 Amostragem e casuística	51
3.1.1 Amostra de análise clínica	. 51
3 1 2 Amostra de análise imuno-histoquímica	52

3.2 Análise imuno-histoquímica	52
3.2.1 Princípios do método	52
3.2.2 Execução do método	53
3.3 Análise Estatística	59
4 RESULTADOS	61
4.1 Análise Descritiva	61
4.2 Fatores de risco para o comprometimento das margens cirúrgicas	63
4.3 Imunomarcação nos subtipos do carcinoma basocelular	78
4.3.1 Imunomarcação com Ber-EP4	88
4.3.2 Imunomarcação com MNF116	91
4.3.3 Imunomarcação com E-Caderina	93
4.3.4 Imunomarcação com VEGF	96
5 DISCUSSÃO	100
6 CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS	118
ANEXOS	143
ARTIGO	145

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma basocelular

1.1.1 Epidemiologia e etiopatogenia

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

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

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

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

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

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

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

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

Algumas síndromes genéticas levam a maior propensão ao desenvolvimento de múltiplos CBC, tais como síndrome do nevo basocelular (síndrome de Gorlin), síndrome de Bazex e síndrome de Rombo (Castori et al., 2012).

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

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

1.1.2 Manifestações clínicas

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

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

Clinicamente, divide-se o CBC em subtipos, sendo os mais comuns o nodular e o superificial.

O CBC nodular é o subtipo clínico mais comum. Consiste em pápula ou nódulo translúcido, geralmente com telangiectasias e borda infiltrada (Figura 1a e 1b). Além disso, apresenta crescimento insidioso e pode ulcerar na superfície. O diagnóstico diferencial é feito, principalmente, com nevo intradérmico, tumores de anexo e hiperplasia sebácea (McCormack et al., 1997).

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

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

O CBC superficial é caracterizado por placa ou *patch* eritematoso, bem delimitado, lembrando uma lesão eczematizada (Figura 1c), muitas vezes pigmentados (Saldanha et al., 2003). A epiderme que compõe a área central da lesão é geralmente atrófica, com escama aderente, de crescimento centrífugo. Encontram-se predominantemente no tronco e, quando associado ao aumento da vascularização, deve-se diferenciar da doença de Paget e da doença de Bowen (McCormack et al., 1997).

Já o esclerodermiforme é variante de crescimento agressivo, que recebe o nome por promover uma intensa fibrose assemelhando-se a uma lesão de morfeia. Apresenta-se como uma placa solitária, amarelada e discretamente atrófica (Figura 1e e 1f). Essa lesão possui limites imprecisos, mas através da palpação é possível observar a infiltração da derme. Por apresentar uma infiltração dérmica superior a epidérmica, quando ocorre a ulceração, esta é tardia (Raasch et al., 2006).

O CBC gigante é definido como uma lesão maior de cinco centímetros de diâmetro (Figura 1d), agressiva e com alto risco de recorrência e morbimortalidade (Archontaki et al., 2009).



Figura 1 - Aspectos clínicos do CBC.

(a) CBC nodular: pápula perlácea, com telangiectasias e exulcerações; (b) CBC nodular: nódulo perláceo, com ulcerações e crostas, pigmentado; (c) CBC superficial: patch eritematoso, descamativo, com bordas perláceas; (d) CBC gigante: tumoração eritematosa e vegetante com pontos de sangramento e algumas áreas de crostas, com aspecto perolado nas regiões epitelizadas. (e) CBC esclerodermiforme: lesão eritematosa com hipocromia central e aspecto cicatricial em dorso. (f) CBC esclerodermiforme (detalhe): placa eritematosa, centro cicatricial com telangectasias em bordas e ulceração e crosta em terço distal.

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

1.1.3 Diagnóstico e prognóstico

O diagnóstico pode ser inferido através do exame clínico dermatológico, sendo que o refinamento diagnóstico pode ser obtido com o uso do dermatoscópio (Figura 2). Um estudo demonstrou que a acurácia diagnóstica é de 70% para dermatologistas experientes, 65% para dermatologistas em início de carreira e 64% entre os residentes da área (Presser et al., 1987).

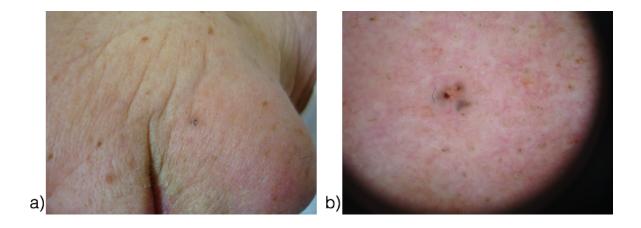


Figura 2 - Aspecto clínico do CBC nodular e pigmentado – Diagnóstico Dermatoscópico.

(a) Pápula algo perolada com 3 pontos pigmentados, cujo diagnóstico diferencial é comedo aberto. (b) Dermatoscopia (10x) mostrando telangectasias, exulcerações, pontos de pigmento azulado tipo ninhos ovoides.

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

Tabela 1 - Fatores que influenciam o prognóstico do CBC

Fator	Risco de recorrência		
i atoi	Baixo Risco	Alto Risco	
Dimensão	Tumores < 2 cm	Tumores > 2 cm	
		Regiões centro faciais,	
Localização	Tronco, extremidades,	especialmente ao redor	
Localização	couro cabeludo, malar	de olhos, nariz, lábios e	
		orelhas	
Definição das margens	Margens bem	Margens mal delimitadas	
cirúrgicas	delimitadas	iviargens mar delimitadas	
	Nodular e superficial	Micronodular,	
Tipo histológico		esclerodermiforme e	
		infiltrativo	
Características	Envolvimento perineural	Envolvimento perineural	
histológicas da	ausente	presente	
agressão	data	procente	
Falha de tratamentos	Lesões primárias	Lesões recorrentes	
prévios	200000 primanao		
Imunossupressão	Ausência de	Presença de	
a.ioooapiooodo	imunossupressão	imunossupressão	

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).

1.1.4 Histopatologia

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

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

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

Assim como na clínica, o CBC também é subdividido histologicamente: nodular, superficial, esclerodermiforme, micronodular e outros.

No subtipo nodular, observam-se massas nodulares de células basaloides que se estendem para a derme papilar ou reticular, podendo ocorrer formação de espaços císticos gerados pela necrose tumoral, presença de mucina ou perda da adesão celular. A formação de paliçada de células na periferia do tumor é característica. A diferenciação em outros elementos – como glândulas

écrinas, sebáceas e outras – pode ser visualizada nos tumores nodulares. Cerca de um terço dos casos coexiste o componente superficial (Crowson, 2006). A presença de melanina indica o componente pigmentado observado na clínica (Figura 3a).

Já o superficial é caracterizado pela proliferação de células basaloides atípicas formando um eixo paralelo com a epiderme, com fendas intercelulares preenchidas por material mucinoso, que é, presumidamente, produzido pelas células estromais (Figura 3b). As mitoses são infrequentes e os pigmentos de melanina podem ser encontrados ocasionalmente. É recorrente por apresentar múltiplos focos de neoplasia (Saldanha et al., 2003).

Caracteristicamente, o esclerodermiforme se apresenta como faixas finas, ou cordões de células neoplásicas invasivas em um estroma densamente colagenizado, com invasão neoplásica da derme reticular e tecido subcutâneo (Figura 3c). Pode coexistir com outras variantes morfológicas de crescimento agressivo (Takei et al., 1985).

O CBC micronodular apresenta, assim como o nodular, ninhos de células basaloides, porém de menor tamanho e de distribuição assimétrica, estendendo-se para a derme profunda e para o tecido celular subcutâneo. Sexton (1990), Hendrix (1996) e seus colaboradores sugeriram que essas lesões sejam uma variante intermediária entre o subtipo nodular e os subtipos de crescimento agressivo, devido ao fato de serem acompanhadas por proliferação do estroma com características infiltrativa e recidivante (Figura 3d).

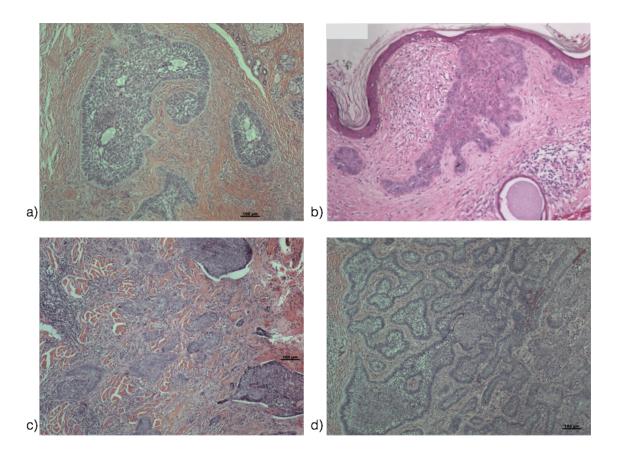


Figura 3 - Aspectos histológicos dos diferentes tipos de CBC.

(a) CBC nodular com ninhos de células basaloides formando paliçada e retração ao redor das massas tumorais. (b) CBC superficial com massa tumoral de células basaloides que tocam a epiderme. (c) CBC esclerodermiforme com cordões de células basaloides entre tecido de aspecto cicatricial com colágeno espesso e algumas massas formando paliçada e retração peri-tumoral. (d) Pequenas massas tumorais semelhante ao nodular, mas com dimensões menores (cerca de 15 μm) [H&E 100x].

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

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

CBC com diferenciação ductal (Grosshans et al., 2003), o CBC com diferenciação mioepitelial (Zheng et. al., 2011), além do fibroadenoma de Pinkus.

1.1.5 Opções terapêuticas

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

Antes de definir a opção terapêutica a ser utilizada, deve-se levar em consideração os fatores que influenciam o prognóstico dos CBC (Tabela 1), além de fatores específicos dos pacientes (estado geral, comorbidades, uso de antiagregantes plaquetários ou anticoagulantes).

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

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

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

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

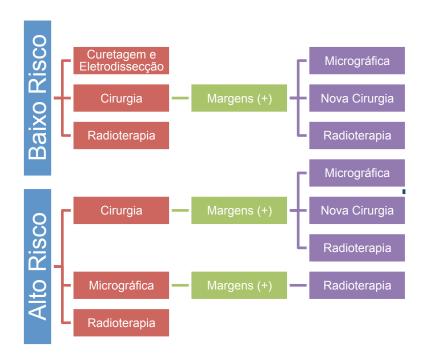


Figura 4 - Algoritmo para tratamento do CBC

Adaptado de: *NCCN Guidelines – Basal and Squamous Cell Carcinoma, versão 2.2013.*

1.1.5.1 Cirurgia convencional

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

A ressecção incompleta reflete a extensão subclínica do tumor. Outros fatores também podem estar relacionados com a falha no tratamento, tais como a falta de experiência do cirurgião, a região anatômica, o subtipo histológico e a realização de múltiplas exéreses durante um mesmo procedimento. De Silva et al. (1985) encontraram 41% de recorrência em CBC com ressecção incompleta. Já

Sussman e Liggins (1996) descreveram 30% de recorrência para ressecções incompletas, sugerindo um seguimento de pelo menos três anos para acompanhamento de recidivas. A chance de recorrência aumenta quando ambas as margens da excisão estão acometidas, quando a exérese incompleta ocorreu em CBC após radioterapia, ou quando há o acometimento de margens profundas. Robinson e Fisher (2000) avaliaram CBC ressecados de forma incompleta, identificaram que o intervalo entre os sinais e sintomas de recorrência e a realização da cirurgia de Mohs foi maior em homens, em indivíduos maiores de 65 anos, que apresentavam tumores no nariz ou região malar, nos subtipos agressivos ou fibrosantes e naqueles que receberam enxertia (p=0,001).

Concluíram que, devido a maior dificuldade de controle do CBC recorrente o tratamento da margem no pós-operatório no menor período possível leva a cirurgias menos extensas. Caso a reabordagem seja optada em detrimento do seguimento pós-operatório, as técnicas de cirurgia convencional e de cirurgia micrográfica de Mohs são as melhores opções (Telfer et al., 2008).

1.1.5.2 Cirurgia micrográfica de Mohs

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

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

Tabela 2 - Indicações da cirurgia micrográfica de Mohs

Localização em área de alto risco anatômico, incluindo a face, o escalpo, a região periorbital e as sobrancelhas.

Tumores maiores de 2,0 cm.

Subtipos histológicos agressivos.

Tumores recorrentes.

CBC ressecados de forma incompleta.

Locais de radioterapia prévia.

Pacientes imunossuprimidos por transplante de órgão sólido.

Margem clínica indistinguível.

Situações que requerem conservação de tecido para preservação da função e cosmética.

Envolvimento perivascular e perineural.

Legenda: CBC: carcinoma basocelular.

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

1.1.5.3 Curetagem e eletrocoagulação e criocirurgia

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

Atualmente, a curetagem e eletrocoagulação tem sido combinada com várias modalidades terapêuticas tópicas como o imiquimod (Wu et al.,2006), a terapia fotodinâmica (Soler et al., 2001) e até mesmo a criocirurgia (Nordin et al., 2002), a fim de atingir uma maior possibilidade de destruição completa do tumor.

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

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

1.1.5.4 Métodos imunológicos e terapias sistêmicas

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

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

Estudos do mecanismo de ação do imiquimod indicaram a presença de ativação de células *natural killer* (NK) (imunidade inata), linfócitos T (resposta imune adaptativa), células apresentadoras de antígeno (APC), e citocinas de padrão Th1 (Gaspari; Sauder, 2010). Urosevic et al. (2003) demonstraram que após o uso do imiquimod as células tumorais se tornaram mais susceptíveis a

apoptose devido a diminuição da expressão de Bcl-2 (B cell Lymphoma 2). A resposta inflamatória foi mista com macrófagos e linfócitos, peri e intratumoral, gerando aumento de produção de IL-10.

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

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

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

1.1.5.5 Terapia fotodinâmica e radioterapia

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-aminolevulínico, que é mais lipofílico que o anterior, apresentando maior seletividade pelo tumor. Marmur e colaboradores (2004) revisaram casos de terapia fotodinâmica em cânceres de pele não-melanoma e, relataram tratamento efetivo

em 100% dos CBCs, porém com taxas de recorrência entre zero a 31%, sendo taxas muito próximas ao tratamento com radioterapia. Mesmo assim devendo ficar restrito para CBCs entre 1 a 2 mm de espessura.

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

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

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

1.2 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 Fatores 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 (Han et al., 2006, 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).

Dentre os fatores socioambientais, os já comprovadamente associados ao CBC são: sexo masculino, fototipo 1, queimaduras solares prévias e o fumo (Ramos et al., 2004, Pandeya et al., 2005).

1.2.2 Fatores Preditores de Desenvolvimento de Múltiplos CBC

É comum a ocorrência de múltiplos CBCs 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 CBCs com polimorfismo nos genes implicados na produção de TNF-alfa 1, 2, 4, 6, 7 e 10, além do gene da Glutaiona 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 CBCs, enquanto que aqueles que tiveram 10 CBCs prévios, essa probabilidade sobre para 90% (Bath-Hextall et al., 2007 Allen et al., 2007).

1.2.3 Fatores Preditores de Recorrência do CBC

Em relação à recorrência dos CBCs, há menos estudos e constatações. No âmbito genético, sabe-se que a aneuploidia é mais presente nos paciente com CBCs 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 CBCs 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 ao tumores primários (Tang et al., 1993, Yerebakan et al., 2003, Jackson 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 demonstrado a 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 carcinoma basocelular 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 mais ou menos agressivos, clinicamente. 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 são marcadas por este anticorpo são: carcinomas de mama, esôfago, estômago, rim, pâncreas, fígado, ovário. Nestes órgãos, os carcinomas espinocelulares são imunomarcados na camada mais externa pelo Ber-EP4, o que não ocorre no carcinoma espinocelular de pele, assim como não imunomarca os ceratinócitos de epiderme normal, apesar de corar glândulas sudoríparas, sebáceas e folículo piloso, que servem como controle positivo interno da imuno-histoguímica (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 imunomarcação diferencial com a graduação 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. Mleczko e colaboradores (2011) publicaram um caso de CBC em região palmar, com marcação positiva para MNF116 (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), demostraram em modelo animal que há formação de CBC me 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 imunoreatividade 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 a ceratoses actínica.

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 basaloides 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 pancitoqueratinas positivas (Kurokawa et al., 2011).

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

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

As Caderinas são glicoproteínas transmembrana de adesão celular Ca²⁺ 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 o esclerodermiforme 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 CBCs nodulares e superficiais e marcação fraca ou heterogênea em CBCs 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 nãomelanoma, 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.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando-se que as diversas apresentações clínicas e histológicas do CBC, que evoluem com variáveis comportamentos relacionados ao risco de invasão, destruição local e recorrência, o presente estudo tem o propósito de analisar marcadores clínicos preditivos do comprometimento das margens cirúrgicas do CBC, em conjunto com um painel de marcadores por imuno-histoquímica (IHQ).

2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer relações entre sexo e idade dos pacientes, localização, dimensão, presença de ulceração, tipo histológico do tumor, e a especialidade responsável pela excisão do carcinoma basocelular;
- b) Analisar possíveis fatores relacionados ao desfecho de margens cirúrgicas comprometidas;
- c) Comparar os padrões de diferentes imunomarcadores entre os variados subtipos histológicos de carcinomas basocelulares;
- d) Analisar a frequência de positividade, a intensidade e o padrão da imunomarcação e a disposição dos focos de células tumorais por IHQ nos diferentes subtipos de CBC;
- e) Identificar grupos de risco para o comprometimento das margens cirúrgicas;
- f) Estabelecer fatores preditores do risco do comprometimento de margens cirúrgicas no tratamento do carcinoma basocelular.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Amostragem e casuística

3.1.1 Amostra da análise clínica

Inicialmente, foi realizada busca com o uso do termo carcinoma basocelular no banco de dados do Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de janeiro a dezembro de 2011. Este trabalho foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP com o número 16.821/2011.

Após obtenção dos registros, foram analisados todos os laudos anatomopatológicos emitidos no determinado período. A coleta de dados foi padronizada para aquisição dos seguintes fatores: sexo, idade, tamanho do tumor, local, ulceração, tipo histológico, especialidade responsável pela remoção do tumor, e o desfecho de margens cirúrgicas (livre ou comprometida).

Foram selecionados 1296 laudos com o diagnóstico de carcinoma basocelular (CBC), dentre estes, 1004 casos foram registrados como produto de exérese cirúrgica, e 292 casos, de biópsia incisional, que foram excluídos, uma vez que um dos parâmetros analisados era o comprometimento da margem cirúrgica. Em seguida, para finalidade da análise estatística, foram adicionalmente excluídos 330 casos, nos quais ao menos um dos fatores pesquisados não constava na coleta dos dados, o que resultou em uma amostra de 674 casos para análise estatística final.

3.1.2 Amostra da análise imuno-histoquímica

Foram selecionados 40 casos para realização de imuno-histoquímica (IHQ), sendo 10 casos de cada subtipo histológico: nodular, superficial, micronodular e esclerodermiforme. Alguns registros de laudo histopatológico continham blocos parafinados de mais de um tumor excisado do mesmo paciente, que foram todos incluídos na amostra do estudo, o que resultou em 65 tumores: 19 nodulares, 16 superficiais, 18 esclerodermiformes e 12 micronodulares. 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.

3.2 Análise Imuno-histoquímica

3.2.1 Princípio do método

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

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

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

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

3.2.2 Execução do método

As amostras do tumor foram fixadas e inseridas em blocos de parafina, que posteriormente, foram cortados com 4µm de espessura e submetidos 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 MNF116, Dako, Dinamarca), VEGF (clone G153-694, BD, Estados Unidos) e E-Caderina (clone 36/E-Cadherin, BD, Estados Unidos) (Tabela 3).

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. Seguidas por 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. Posterior à incubação *overnight*, as lâminas foram lavadas por três vezes em PBS. Após lavagem, essas

lâminas foram 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, e posteriormente lavadas e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 40 segundos, em temperatura ambiente. Em seguida, foi aplicado hidróxido de amônia, realizado desidratação com álcool, diafanização em xilol e executado a montagem em lâminas Knittel (Knittel Glass, Germany).

Os controles positivos para os anticorpos (Tabela 3) 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 PBS.

Tabela 3 – 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), como exemplificado na figura 5.

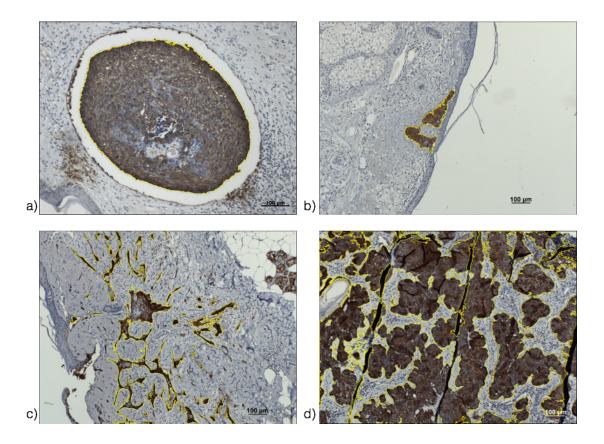


Figura 5 – Delimitação da área imunomarcada através da seleção automática no programa Image J.
 (a) CBC nodular. (b) CBC Superficial. (c) CBC Esclerodermiforme. (d) CBC Micronodular. Todas as imunomarcações deste painel foram realizadas com Ber-EP4.

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 d a 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 6).

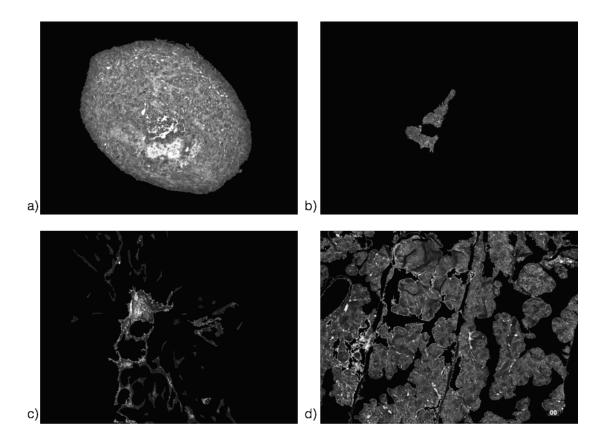


Figura 6 – Eliminação do fundo para análise em 8-bit da área imunomarcada na escala de cinza.
 (a) CBC nodular. (b) CBC Superficial. (c) CBC Esclerodermiforme. (d) CBC Micronodular.

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%), como visto na figura 7. 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).

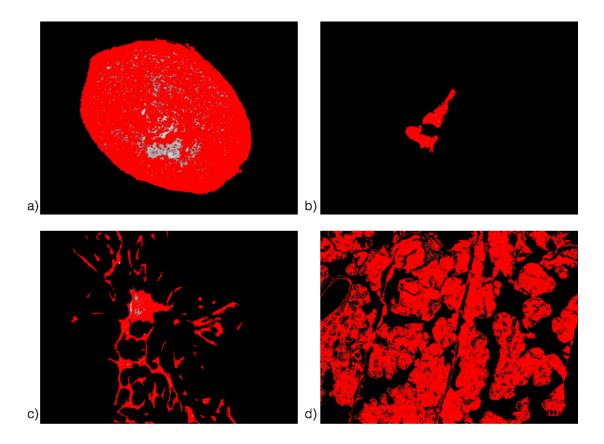


Figura 7 – Determinação de porcentagem de área imunomarcada pelos anticorpos através de limiar de detecção (threshold – máximo da escala de cinza de 127).
 (a) CBC nodular. (b) CBC Superficial. (c) CBC Esclerodermiforme. (d) CBC Micronodular.

Com os dados de escala de cinza da marcação global do tumor, utilizou-se uma fórmula matemática (150 – 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 8:

```
Escala de Cinza: 0 = preto 150 = background

Intensidade (I) = 150 - Escala de Cinza (EC)

Intensidade: 150 = preto 0 = background
```

Figura 8 – 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): Escore = Intensidade x % Área, com valores do escore variando entre zero a 150.

Para contagem de células inflamatórias imunomarcadas pelo VEGF, uma média de 8 a 10 campos foram selecionados de cada lâmina para a análise quantitativa. As células foram consideradas positivas para o marcador na presença de imunoprecipitado castanho ao redor da membrana plasmática das mesmas. 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 9).

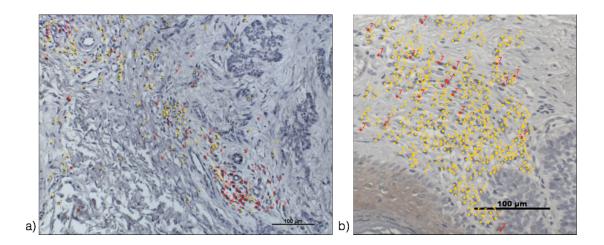


Figura 9 – Exemplo de contagem de células imunomarcadas com o anticorpo anti-VEGF, mostrando em amarelo células inflamatórias negativas e em vermelho as células positivas para VEGF com auxílio do *software* Image J v1.49. (a) Aumento 200x. (b) Aumento 400x.

3.3 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*).

Na análise estatística, foi realizado cruzamento de dados entre as variáveis categóricas (sexo, especialidade, localização, presenção de ulceração, subtipo histológico e idade categorizada) por meio do teste Qui-quadrado (X²).

Para analise de cruzamento entre variáveis numéricas e categóricas, realizou-se a análise de variâncias (ANOVA). Para análise univariada das margens comprometidas como variável dependente, utilizou-se o teste t para idade e tamanho (numéricas), curva ROC para categorização de idade, e teste X² para sexo, especialidade, localização, presença de ulceração e subtipo histológico (variáveis categóricas). Para análise multivariada das margens comprometidas, utilizou-se a regressão logística binária multivariada.

Para análise estatística da marcação imuno-histoquímica dos anticorpos Ber EP4, MNF 116 e E-Caderina, utilizou-se ANOVA, Kruskal-Wallis e Teste t, pois as medidas analisadas foram variáveis numéricas (intensidade de

marcação, porcentagem de marcação e escore). Já para o anticorpo VEGF, utilizou-se ANOVA e Teste t para as variáveis numéricas número de células inflamatórias totais e porcentagem de células inflamatórias marcadas.

O nível de significância adotado foi com valor de *p*≤ 0,05.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise Descritiva

Foram analisados 1294 laudos histopatológicos de CBC emitidos pelo SERPAT do HCFMRP-USP, no período de janeiro a dezembro de 2011. Dentre estes, 1004 casos compreendiam excisão cirúrgica completa do tumor e os demais casos, biópsias. Foram incluídos 674 casos de excisão cirúrgica completa e excluídos 330 casos que não continham ao menos um dos parâmetros a serem considerados nas análises univariada e multivariada de regressão logística.

Na amostra de 674 casos de CBC removidos por cirurgia, 407 eram indivíduos masculinos (60,4%) e 267 femininos (39,6%) [Gráfico 1b]. A idade média foi de 68 anos, sendo a mínima de 22 e a máxima de 95 anos, com picos entre a quinta e oitava décadas da vida [Gráfico 1a]. A idade média no sexo masculino e no feminino foi exatamente a mesma, 68 anos.

Segundo a distribuição topográfica, houve predomínio do segmento cefálico (71%), seguido do tronco (17%) e membros (12%) [Gráfico 1c]. Dentre os subtipos histológicos, prevaleceu o nodular (61%), seguido do superficial (14%), micronodular (12%), esclerodermiforme (10%) e outros [infiltrativo e basoescamoso] (3%) [Gráfico 1d]. A prevalência da ulceração dos tumores, por avaliação histopatológica, foi de 41%.

Dentre os 674 casos tratados cirurgicamente, a especialidade Dermatologia foi responsável pela maioria das cirurgias com 78% dos casos (n= 526), seguida da Cirurgia de Cabeça e Pescoço [CCP] (11%; n= 74), Oftalmologia (5%; n= 34), Cirurgia Plástica (4%; n= 27) e outras especialidades não especificadas (2%; n= 13) [Gráfico 1e].

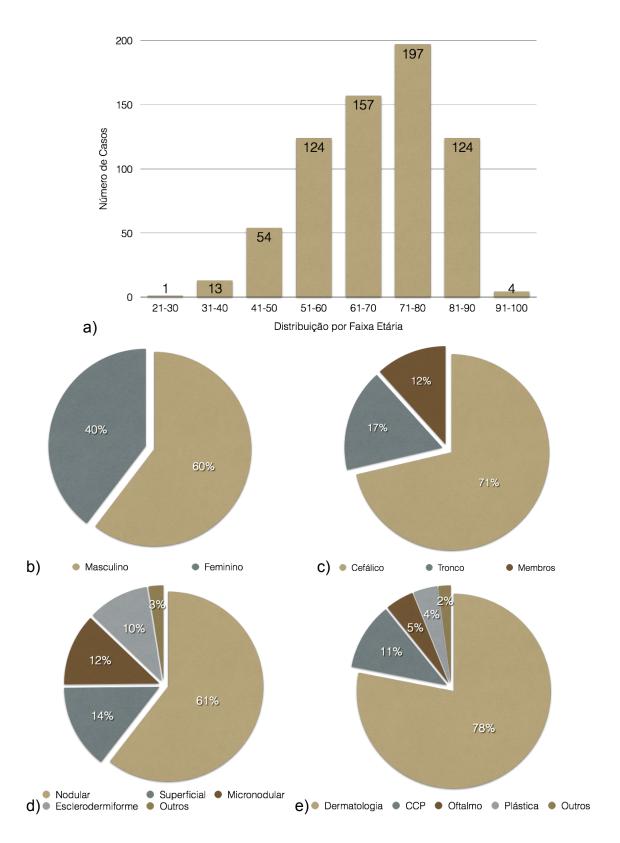


Gráfico 1 – Gráficos da análise descritiva:

(a) Distribuição por faixa etária, dos casos de CBC. (b) Distribuição segundo sexo de casos com diagnóstico de CBC. (c) Distribuição topográfica dos casos de CBC removidos por cirurgia. (d) Distribuição dos tipos histológicos de CBC. (e) Distribuição do percentual das cirurgias para remoção de CBC entre as especialidades. Total de casos n= 674, todos removidos por cirurgia no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011.

A dimensão média dos tumores excisados foi de 274 mm² na Dermatologia, 279 mm² na Cirurgia Plástica, 218 mm² na CCP, 87 mm² na Oftalmologia, e 388 mm² nas outras clínicas. O índice de margens livres de cada especialidade foi de 95% para a Dermatologia, 89% para a Cirurgia Plástica, 60% para CCP, 49% para Oftalmologia e 80% para outras clínicas [Gráfico 2].

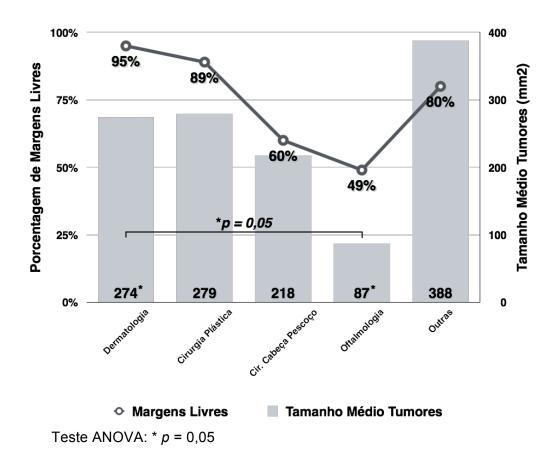
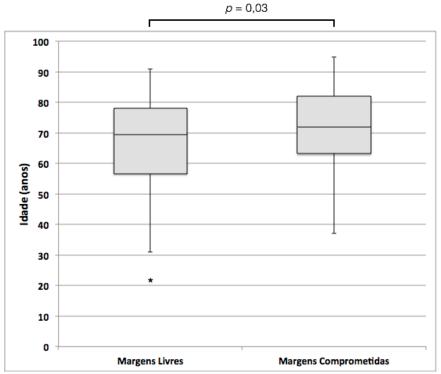


Gráfico 2 – Relação entre dimensão dos tumores excisados (n= 674) e índice de margens livres, em acordo com a especialidade responsável pelo procedimento no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011.

4.2 Fatores de risco para o comprometimento das margens cirúrgicas

A análise univariada para identificação de fatores de risco para margens comprometidas (variável dependente) revelou associação com idade (idade média de 67,7 anos para margens livres x 71,1 anos para margens comprometidas; teste t: p=0,03) [Gráfico 3]. A análise da curva ROC para

estimativa da idade de maximização para o desfecho em margens comprometidas definiu corte de 73 anos. No entanto, a análise pelo teste Qui Quadrado (X^2) desta categorização não mostrou diferença estatística significativa de margens comprometidas entres os grupos <73 anos e >73 anos (p= 0,19).



Teste t; p = 0.03

Gráfico 3 – Relação entre idade e margens cirúrgicas livres ou comprometidas de CBC excisados (n= 674): idade média inferior (67,7 anos) para margens livres e superior (71,1 anos) para margens comprometidas. Asterisco (*) demonstra outliers.

A análise estatística pelo teste X^2 das variáveis relacionadas entre si, mostrou predominância do sexo feminino na Oftalmologia em relação à Dermatologia (62,5% x 14,3%; p= 0,02), CCP (62,5% x 28%; p= 0,006) e outras clínicas (62,5% x 40,3%; p= 0,05) [Tabela 4].

Tabela 4 - Distribuição segundo sexo e especialidade responsável pela cirurgia de casos de CBC (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	SE)	Sexo		
ESPECIALIDADE	FEMININO N (%)	MASCULINO N (%)	TOTAL N (%)	
DERMATOLOGIA	212 (40,3) ^c	314 (59,7)	526 (100)	
CIRURGIA PLÁSTICA	12 (44,4)	15 (55,6)	27 (100)	
CIR. CABEÇA E PESCOÇO	21 (28) ^b	54 (72)	75 (100)	
OFTALMOLOGIA	20 (62,5) ^{a, b, c}	32 (37,5)	42 (100)	
Outras	2 (14,3) ^a	12 (85,7)	14 (100)	
TOTAL	267 (39,6)	407 (60,4)	674 (100)	

Teste X^2 : a p = 0.02; b p = 0.006; c p = 0.05

Para a idade categorizada (73 anos), a frequência de pacientes acima de 73 anos foi significantemente inferior nas especialidades não especificadas (Outras) comparada às demais especialidades: Dermatologia (7,1% x 39,5%; p< 0,01), CCP (7,1% x 53,3%; p< 0,01), Cirurgia Plástica (7,1% x 59,3%; p< 0,01) e Oftalmologia (7,1% x 53,1%; p< 0,01). Também para pacientes acima de 73 anos, houve predominância deste segmento de paciente na CCP comparada à Dermatologia (53,3% x 39,5%; teste X^2 : p= 0,05) [Tabela 5].

Tabela 5 – Distribuição segundo idade categorizada e especialidade responsável pela cirurgia de casos de CBC (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	IDADE CATE	TOTAL	
ESPECIALIDADE	< 73 ANOS N (%)	> 73 ANOS N (%)	TOTAL N (%)
DERMATOLOGIA	318 (60,5)	208 (39,5) ^{a, b}	526 (100)
CIRURGIA PLÁSTICA	11 (40,7)	16 (59,3) ^a	27 (100)
CIR. CABEÇA E PESCOÇO	35 (46,7)	40 (53,3) ^{a, b}	75 (100)
OFTALMOLOGIA	15 (46,9)	17 (53,1) ^a	32 (100)
OUTRAS	13 (92,9)	1 (7,1) ^a	14 (100)
TOTAL	392 (58,2)	282 (41,8)	674 (100)

Teste X^2 : a p < 0.01; b p = 0.05

Na comparação entre a especialidade responsável pela cirurgia dos casos de CBC e a localização do tumor, por motivos evidentes, a frequência da localização do segmento cefálico foi significantemente maior nas especialidades Oftalmologia e CCP (100% em ambas).

Adicionalmente, a presença da ulceração nos casos de CBC excisados foi superior na CCP em relação à Dermatologia (73,3% x 35,2%; p< 0,001); na CCP comparada às outras especialidades não especificadas [Outras] (73,3% x 21%; p< 0,001); e na Oftalmologia comparada à Dermatologia (56,3% x 35,2%; p = 0,05) [Tabela 6].

Tabela 6 – Frequência da ulceração em CBC excisados (n= 674) entre as especialidades responsáveis pela cirurgia no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	ULCEF	RAÇÃO	Ta=	
ESPECIALIDADE	NÃO N (%)	SIM N (%)	TOTAL N (%)	
DERMATOLOGIA	341 (64,8)	185 (35,2) ^{a, c}	526 (100)	
CIRURGIA PLÁSTICA	12 (44,4)	15 (55,6)	27 (100)	
CIR. CABEÇA E PESCOÇO	20 (26,7)	55 (73,3) ^{a, b}	75 (100)	
OFTALMOLOGIA	14 (43,8)	18 (56,3) ^c	32 (100)	
Outras	11 (78,6)	3 (21,4) ^b	14 (100)	
TOTAL	398 (59,1)	276 (40,9)	674 (100)	

Teste X^2 : $^a p = 0.001$; $^b p < 0.001$; $^c p = 0.05$

O percentual de CBC do tipo histológico superficial foi superior na Dermatologia em relação à CCP (17,1% x 4%; p= 0,01) e comparada à Oftalmologia (17,1% x 0%; p= 0,03) [Tabela 7].

Tabela 7 – Distribuição segundo tipo histológico e a especialidade responsável pela cirurgia CBC (n=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

_	TIPO HISTOLÓGICO					TOTAL
ESPECIALIDADE	CBCN N (%)	CBCs N (%)	CBCE N (%)	CBCM N (%)	Outros N (%)	N (%)
DERMATOLOGIA	318 (60,5)	90 (17,1) ^{a, b}	45 (8,6)	62 (11,8)	11 (2,1)	526 (100)
CIRURGIA PLÁSTICA	16 (59,3)	3 (11,1)	3 (11,1)	5 (18,5)	0 (0)	27 (100)
CIR. CABEÇA E PESCOÇO	48 (64,0)	3 (4,0) ^a	12 (16)	10 (13,3)	2 (2,7)	75 (100)
OFTALMOLOGIA	18 (56,3)	0 (0) ^b	6 (18,8)	6 (18,8)	2 (6,3)	32 (100)
Outras	9 (64,3)	1 (7,1)	4 (28,6)	0 (0)	0 (0)	14 (100)
TOTAL	409 (60,7)	97 (14,4)	70 (10,4)	83 (12,3)	15 (2,2)	674 (100)

CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; CBCe: carcinoma basocelular esclerodermiforme; CBCm: carcinoma basocelular micronodular; Teste X^2 : ${}^a p = 0.01$; ${}^b p = 0.03$

A análise entre dimensão do tumor e especialidade responsável pela cirurgia mostrou o diâmetro médio dos CBC excisados pela Dermatologia é maior comparado ao daqueles removidos Oftalmologia (teste ANOVA: 273,49 mm 2 x 86,94 mm 2 ; p= 0,05) [Tabela 8].

Tabela 8 – Distribuição segundo dimensão de casos de CBC excisados (n= 674) e a especialidade responsável pela cirurgia no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

ESPECIALIDADE	TAMANHO MÉDIO (mm²)	DESVIO PADRÃO
DERMATOLOGIA	273,49ª	418,889
CIRURGIA PLÁSTICA	279,56	266,043
CIR. CABEÇA E PESCOÇO	218,91	204,329
OFTALMOLOGIA	86,94 ^a	74,276
Outras	388,50	455,909
TOTAL	261,19	388,055

Teste ANOVA: $^{a}p = 0.05$

A comparação entre os sexos não mostrou diferença estatística (teste $X^2 = 2,20$; p = 0,14) nos grupos distribuídos segundo a idade categorizada (≤ 73 anos x >73 anos). Já a análise da relação entre sexo e localização dos tumores mostrou que CBC em membros é mais prevalente no sexo feminino (teste X^2 : 15,4% x 9,3%; p = 0,05) [Tabela 9].

Tabela 9 – Distribuição segundo sexo e localização de casos de CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

		TOTAL		
SEXO	CABEÇA N (%)	Tronco n (%)	MEMBROS N (%)	TOTAL N (%)
FEMININO	185 (69,3)	41 (15,4)	41 (15,4) ^a	267 (100)
MASCULINO	296 (72,7)	73 (17,9)	38 (9,3) ^a	407 (100)
TOTAL	481 (71,4)	114 (16,9)	79 (11,7)	674 (100)

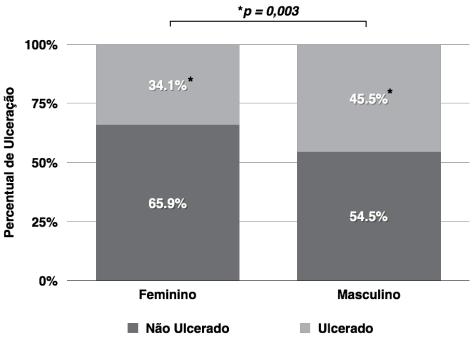
Teste X^2 : a p = 0.05

A ulceração foi mais prevalente nos pacientes do sexo masculino (teste X^2 : 45,5% x 34,1%; p= 0,003) [Tabela 10 e Gráfico 4], assim como o diâmetro médio dos tumores foi superior no sexo masculino comparado ao do feminino (teste ANOVA: 307,41 mm² x 190,74 mm²; p< 0,001) [Tabela 11 e Gráfico 5]. No entanto, não foi observada diferença entre os sexos no que se refere ao tipo histológico do CBC (teste X^2 ; p= 0,11).

Tabela 10 – Distribuição segundo sexo e presença de ulceração nos CBC excisados (n=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	ULCER	AÇÃO	TOTAL
Sexo	NÃO N (%)	SIM N (%)	TOTAL N (%)
FEMININO	176 (65,9)	91 (34,1) ^a	267 (100)
MASCULINO	222 (54,5)	185 (45,5) ^a	407 (100)
TOTAL	398 (59,1)	276 (40,9)	674 (100)

Teste X^2 : a p = 0.003



Teste X^2 : * p= 0,003

Gráfico 4 – Relação entre sexo e presença de ulceração tumoral no CBC (n= 674), período de janeiro a dezembro de 2011.

Tabela 11 – Distribuição segundo sexo do paciente e tamanho dos CBC excisados (n=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

Sexo	TAMANHO M ÉDIO (mm²)	DESVIO PADRÃO
FEMININO	190,74 ^a	249,992
MASCULINO	307,41ª	450,851
TOTAL	261,19	388,055

Teste ANOVA: a p < 0,001

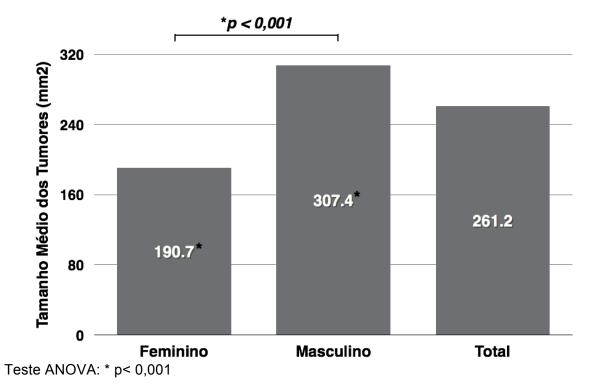


Gráfico 5 – Relação entre sexo e tamanho médio dos tumores no CBC (n= 674), período de janeiro a dezembro de 2011 [Teste ANOVA: * p< 0,001].

A comparação entre idade categorizada (73 anos) e localização, mostrou que em pacientes mais jovens (< 73 anos), há predominância de CBC no tronco comparado ao segmento cefálico (teste X^2 : 77,2% x 52,8%; p= 0,001) [Tabela 12].

Tabela 12 – Distribuição segundo idade categorizada e localização dos CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	IDADE CATE	GORIZADA	TOTAL	
LOCALIZAÇÃO	< 73 ANOS N (%)	> 73 ANOS N (%)	n (%)	
Савеçа	254 (52,8) ^a	227 (47,2)	481 (100)	
TRONCO	88 (77,2) ^a	26 (22,8)	114 (100)	
MEMBROS	50 (63,3)	29 (36,7)	79 (100)	
TOTAL	392 (58,2)	282 (41,8)	674 (100)	

Teste X^2 : a p = 0.001

Os CBC ulcerados são menos prevalentes no tronco comparado ao segmento cefálico (24,6% x 44,9%; p< 0,001) e membros (24,6% x 40,5%; p = 0,05) [Tabela 13]. O subtipo nodular é predominante no segmento cefálico (63,4% x 43%; p< 0,001) e nos membros (69,9% x 43%; p< 0,001) em relação ao tronco. Já a relação com o subtipo superficial é inversa, sendo predominante em tronco comparado ao segmento cefálico (39,5% x 8,5%; p< 0,001) e membros (39,5% x 13,9%; p< 0,001) [Tabela 14].

Tabela 13 – Distribuição segundo presença da ulceração e localização dos CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	ULCER	ULCERAÇÃO		
LOCAL	NÃO N (%)	SIM N (%)	TOTAL n (%)	
CABEÇA	265 (55,1)	216 (44,9) ^a	481 (100)	
TRONCO	86 (75,4)	28 (24,6) ^{a, b}	114 (100)	
MEMBROS	47 (59,5)	32 (40,5) ^b	79 (100)	
TOTAL	398 (59,1)	276 (40,9)	674 (100)	

Teste X^2 : a p < 0.001 / b p = 0.05

		TOTAL				
LOCALIZAÇÃO	CBCN N (%)	CBCs N (%)	CBCE N (%)	CBCM N (%)	Outros N (%)	N (%)
CABEÇA	305 (63,4) ^b	41 (8,5) ^{c, d}	59 (12,3)	69 (14,3)	7 (1,5)	481 (100)
TRONCO	49 (43,0) ^{a, b}	45 (39,5) ^c	7 (6,1)	9 (7,9)	4 (3,5)	114 (100)
MEMBROS	55 (69,6) ^a	11 (13,9) ^d	4 (5,1)	5 (6,3)	4 (5,1)	79 (100)
TOTAL	409 (60,7)	97 (14,4)	70 (10,4)	83 (12,3)	15 (2,2)	674 (100)

Tabela 14 – Distribuição segundo o tipo histológico e a localização de CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; CBCe: carcinoma basocelular esclerodermiforme; CBCm: carcinoma basocelular micronodular; Teste X^2 : $^a p < 0.001 / ^b p < 0.001 / ^c p < 0.001 / ^d p < 0.001$

O tamanho médio dos tumores é maior no tronco comparado ao segmento cefálico (teste ANOVA: 394 mm² x 226,46 mm²; p< 0,001) [Tabela 15].

Tabela 15 – Distribuição segundo tamanho e localização de CBC excisados (n=674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

LOCALIZAÇÃO	TAMANHO MÉDIO (mm²)	DESVIO PADRÃO	
CABEÇA	226,46 ^a	265,46	
TRONCO	394,00 ^a	691,83	
MEMBROS	281,03	372,31	
TOTAL	261,19	388,06	

Teste ANOVA: a p < 0,001

A presença de tumores ulcerados predominou em relação aos não ulcerados nos pacientes acima de 73 anos (50,4% x 35,9%; p< 0,001) [Tabela 16 e Gráfico 6] e no tipo nodular (62,7% x 59,3%; p = 0,001) [Tabela 17]. Já a ausência de ulceração predominou em relação à ulceração no CBC superficial (20,6% x 5,4%; p = 0,003) [Tabela 17]. De maneira contrária ao que esperávamos, a média de tamanho dos tumores ulcerados foi menor que a média dos não ulcerados: 248 x 270 mm². Não houve diferença estatística na comparação entre a presença de ulceração e o diâmetro médio (teste ANOVA; p = 0,46).

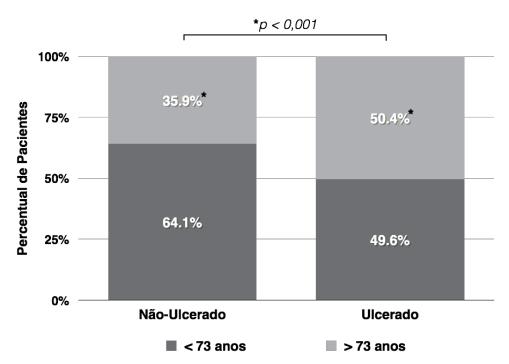


Gráfico 6 – Relação entre idade categorizada (73 anos) e presença de ulceração tumoral no CBC (n= 674), período de janeiro a dezembro de 2011.

Tabela 16 – Distribuição segundo idade categorizada e ulceração dos CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

ULCERAÇÃO	IDADE CATE	TOTAL N (%)		
ULCERAÇÃO	< 73 ANOS N (%)	> 73 ANOS N (%)	TOTAL N (70)	
NÃO	255 (64,1)	143 (35,9) ^a	398 (100)	
SIM	137 (49,6)	139 (50,4) ^a	276 (100)	
TOTAL	392 (58,2)	282 (41,8)	674 (100)	

Teste X^2 : a p < 0.001

Tabela 17 – Distribuição segundo tipo histológico e presença de ulceração dos CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	TIPO HISTOLÓGICO					TOTAL
ULCERAÇÃO	CBCN N (%)	CBCs N (%)	CBCE N (%)	CBCM N (%)	Outros N (%)	TOTAL N (%)
NÃO	236 (59,3) ^a	82 (20,6) ^b	26 (6,5)	46 (11,6)	8 (2)	398 (100)
SIM	173 (62,7) ^a	15 (5,4) ^b	44 (15,9)	37 (13,4)	7 (2,5)	276 (100)
TOTAL	409 (60,7)	97 (14,4)	70 (10,4)	83 (12,3)	15 (2,2)	674 (100)

CBCn: carcinoma basocelular nodular; CBCs: carcinoma basocelular superficial; CBCe: carcinoma basocelular esclerodermiforme; CBCm: carcinoma basocelular micronodular; Teste X^2 : $^a p = 0,001$; $^b p = 0,003$

Nos pacientes abaixo de 73 anos, houve predomínio do subtipo superficial comparado ao nodular (80,4% x 52,8%; p< 0,001, Teste X^2) e ao esclerodermiforme (80,4% x 47,5%; p< 0,001), além de predomínio do micronodular em relação ao esclerodermiforme (66,3% x 45,7%; p= 0,04) [Tabela 18].

Não foi observada relação estatística entre o diâmetro médio e os tipos histológicos de CBC (teste ANOVA; p = 0.97). A correlação entre o diâmetro médio dos tumores e a idade como variável numérica também não mostrou diferença estatística (coeficiente de correlação de Pearson; p = 0.24).

Tabela 18 – Distribuição segundo tipo histológico e idade categorizada dos pacientes com CBC excisados (n= 674) no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

	IDADE CATE			
TIPO HISTOLÓGICO	< 73 ANOS N (%)	> 73 ANOS N (%)	TOTAL N (%)	
Nodular	216 (52,8) ^a 193 (47,2)		409 (100)	
SUPERFICIAL	78 (80,4) ^{a, b}	19 (19,6)	97 (100)	
ESCLERODERMIFORME	32 (45,7) ^{b, c}	38 (54,3)	70 (100)	
MICRONODULAR	55 (66,3) ^c	28 (33,7)	83 (100)	
Outros	11 (73,3)	4 (26,7)	15 (100)	
TOTAL	392 (58,2)	282 (41,8)	674 (100)	

Teste X^2 : ^a p < 0.001; ^b p < 0.001; ^c p = 0.04

Pela análise univariada, a localização revelou ser fator determinante para o comprometimento das margens cirúrgicas, sendo o segmento cefálico de maior risco comparado ao tronco (OR 20; IC 95% 2,94 – 100; p< 0,001) e aos membros (OR 14,29; IC 95% 2,0 – 100; p< 0,001). Como mostra a tabela 19, há redução do risco de margens cirúrgicas comprometidas de tumores excisados no tronco e nos membros comparados aos do segmento cefálico (OR 0,05; IC 95% 0,01 – 0,34; p< 0,001 e OR 0,07; IC 95% 0,01 – 0,50; p< 0,001, respectivamente).

O subtipo histológico do CBC também influencia no desfecho do comprometimento das margens cirúrgicas. Os subtipos esclerodermiforme e micronodular apresentam maior risco para o comprometimento das margens comparados ao nodular (OR 2,52; IC 95% 1,30 – 4,86 e OR 2,93; IC 95% 1,61 – 5,34, respectivamente, p= 0,02) e ao superficial (OR 26,18; IC 95% 3,37 – 203,73 e OR 30,48; IC 95% 3,99 – 232,94, respectivamente, p< 0,001). O subtipo superficial mostrou-se com menor risco para o comprometimento das margens comparado ao nodular (OR 0,10; IC 95% 0,01 – 0,71; p= 0,005).

Ainda, a presença de ulceração mostrou maior risco para o desfecho das margens comprometidas (OR 2,43; IC 95% 1,50 – 3,94; *p*< 0,001).

Outro fator positivamente associado ao comprometimento de margens cirúrgicas positivas na análise univariada foi a especialidade responsável pela excisão do CBC. As especialidades Oftalmologia e CCP apresentaram percentuais de margens comprometidas significativamente maiores que a Dermatologia (OR: 16,31; IC 95% 7,36 – 36,12; p= 0,008 e OR: 13,02; IC 95% 7,14 – 23,75; p= 0,008, respectivamente); e a Cirurgia Plástica, menor percentual do comprometimento de margens comparada à Oftalmologia (OR 7,06; IC 95% 1,76 – 28,25; p= 0,03) e à CCP (OR 5,64; IC 95% 1,56 – 20,38; p= 0,03).

Na análise univariada, os fatores dimensão do tumor, sexo e idade categorizada (73 anos) não mostraram relação com o comprometimento das margens cirúrgicas (p= 0,32 - Teste t; p= 0,83 e p= 0,19 - Teste X^2 , respectivamente).

Na análise de regressão logística binária multivariada para identificação de fatores de risco para margens comprometidas (variável dependente) revelou que o subtipo histológico micronodular apresentou o maior risco do comprometimento (OR 3,41; IC 95% 1,71 – 6,80; p= 0,001), e o subtipo

esclerodermiforme, uma forte tendência do comprometimento das margens, mas sem significância estatística (OR 1,90; IC 95% 0.89 - 4.05; p=0.093).

A localização em segmento cefálico é fator de risco para o comprometimento de margens cirúrgicas, comparado ao tronco (OR 8,33 IC 95% 1,05-50; p=0,045) e aos membros (OR 7,69 IC 95% 1,0-50; p=0,05). Na tabela 19, pode ser observado a redução do risco dos tumores excisados no tronco e nos membros comparados aos do segmento cefálico (OR 0,12; IC 95% 0,02-0,95; p=0,045 e OR 0,13; IC 95% 0,02-1,00; p=0,051, respectivamente).

Ainda, os tumores excisados pelas especialidades Oftalmologia e CCP apresentaram maior risco para o desfecho de margens comprometidas (OR 10,12; IC 95% 4,40 - 23,27; p= 0,001 [Oftalmologia] e OR 9,67; IC 95% 5,14 - 18,21; p= 0,001 [CCP]).

Os resultados obtidos nas análises univariada e multivariada dos vários fatores envolvidos para o desfecho de comprometimento das margens cirúrgicas dos CBC excisados (n= 674) por várias especialidades no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011, foram sumariados na tabela 19 disposta a seguir.

Tabela 19 – Análise do risco para desfecho com margens comprometidas nos CBC excisados (n= 674) por diferentes especialidades no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

CARACTERÍSTICAS —	Análise Univari	ADA	ANÁLISE MULTI	Análise Multivariada		
CARACTERISTICAS —	OR (IC 95%)	VALOR-P	OR (IC 95%)	VALOR-P		
TIPO HISTOLÓGICO						
Nodular	1	-	1	-		
SUPERFICIAL	0,1 (0,01-0,71)	<0,001	0,23 (0,03-1,82)	0,166		
ESCLERODERMIFORME	2,52 (1,30-4,86)	<0,001	1,90 (0,89-4,05)	0,093		
MICRONODULAR	2,93 (1,61-5,34)	<0,001	3,41 (1,71-6,80)	0,001		
Outros	4,1 (0,72-23,27)	0,113	1,25 (0,20-7,58)	0,808		
LOCALIZAÇÃO						
SEGMENTO CEFÁLICO	1	-	1	-		
Tronco	0,05 (0,01-0,34)	<0,001	0,12 (0,02-0,95)	0,045		
MEMBROS	0,07 (0,01-0,50)	<0,001	0,13 (0,02-1,00)	0,051		
SEXO						
Masculino	1	-	1	-		
FEMININO	0,76 (0,43-1,50)	0,223	0,9 (0,50-1,60)	0,678		
ULCERAÇÃO						
NÃO	1	-	1	-		
SIM	2,43 (1,50-3,94)	<0,001	1,2 (0,67-2,12)	0,553		
IDADE		•				
<73 ANOS	1	-	1	-		
>73 ANOS	1,2 (0,76-2,34)	0,110	0,97 (0,56-1,72)	0,941		
ESPECIALIDADE						
DERMATOLOGIA	1	-	1	-		
CIRURGIA PLÁSTICA	2,31 (0,65-8,16)	0,170	1,77 (0,40-6,64)	0,393		
CIRURGIA CABECA E PESCOCO	13,0 (7,14-23,75)	<0,001	9,7 (5,14-18,21)	0,001		
OFTALMOLOGIA	16,3 (7,4-36,1)	<0,001	10,1 (4,40-23,3)	0,001		
OUTRAS	3,81 (0,66-14,5)	0,170	3,90 (0,71-21,25)	0,115		
TAMANHO	-	-	1,0 (0,99-1,01)	0,770		

4.3 Imunomarcação nos subtipos do carcinoma basocelular

A reação imuno-histoquímica com os anticorpos Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina mostrou elevada sensibilidade na marcação das células neoplásicas e delimitação do tecido tumoral [Figuras 10 a 13]. Já o anticorpo anti-VEGF evidenciou marcação de células do infiltrado inflamatório peritumoral (PT) e das células endoteliais dos vasos neoformados, e negativa nos tumores [Figura 14].

A seguir, descreveremos os resultados obtidos com ilustrações dos padrões da marcação dos anticorpos em cada tipo do CBC. Na sequencia, 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 tipos histológicos, assim como dos grupos não agressivos (nodular e superficial) e agressivos (esclerodermiforme e micronodular).

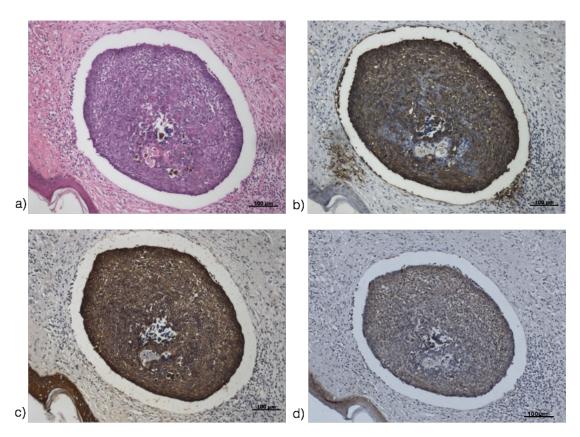
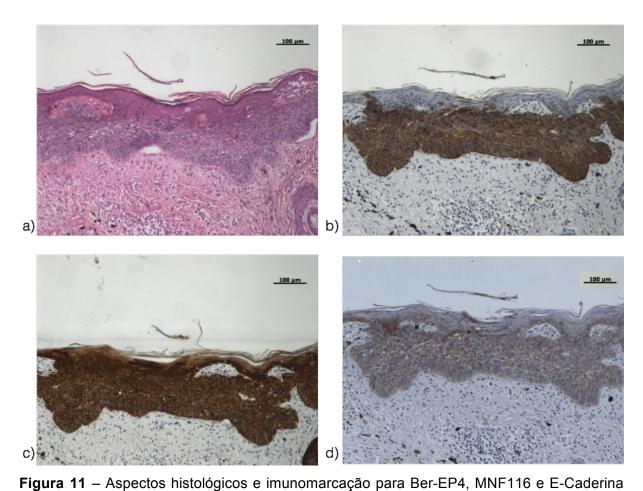


Figura 10 – Aspectos histológicos e imunomarcação para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC nodular:

(a) Típico CBC nodular com ninhos de células basalóides na derme com fenda entre tumor e estroma e paliçada na periferia (H&E 100x); (b) Ber-EP4 com marcação intensa tumoral, mais evidente na região de paliçada e região central com marcação moderada (100x); (c) MNF 116 com marcação intensa tumoral, mais evidente na região de paliçada (100x). (d) E-Caderina com marcação tumoral moderada, mais evidente na região de paliçada e região central com marcação leve (100x).



em CBC superficial:

(a) CBC superficial mostrando proliferação de células basalóides que se ligam à epiderme e formam discreta paliçada (H&E 100x); (b) Ber-EP4 com marcação tumoral intensa e homogênea, poupando epiderme (100x); (c) MNF 116 com marcação tumoral intensa e homogênea, também evidente em epiderme (100x). (d) E-Caderina com marcação tumoral moderada e com distribuição heterogênea (100x).

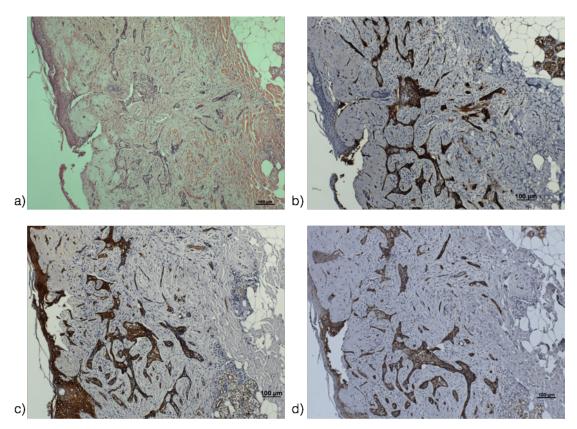


Figura 12 — Aspectos histológicos e da imunomarcação para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC esclerodermiforme:

(a) CBC esclerodermiforme típico com cordões de células basalóides na derme com formação fibrosante ao redor dos cordões tumorais (H&E 100x); (b) Ber-EP4 com marcação tumoral intensa e levemente heterogênea (100x); (c) MNF 116 com marcação tumoral intensa e homogênea, marcando também epiderme (100x); (d) E-Caderina com marcação tumoral moderada e heterogênea (100x).

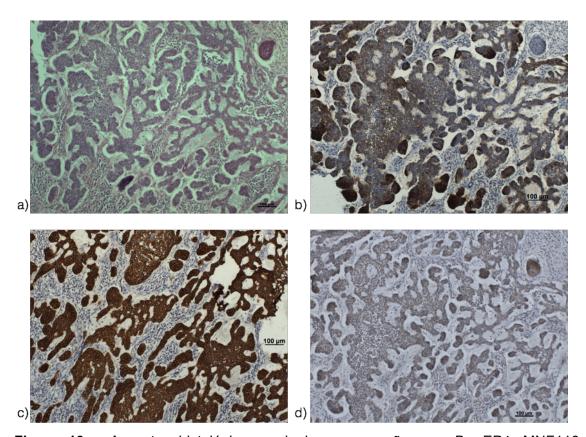


Figura 13 – Aspectos histológicos e da imunomarcação para Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina em CBC micronodular:

 (a) CBC micronodular típico múltiplas formações tumorais individualizadas com algumas interligadas na derme (H&E 100x); (b) Ber-EP4 com marcação tumoral moderada e heterogênea (100x); (c) MNF 116 com marcação tumoral intensa e homogênea (100x); (d) E-Caderina com marcação tumoral leve e heterogênea (100x).

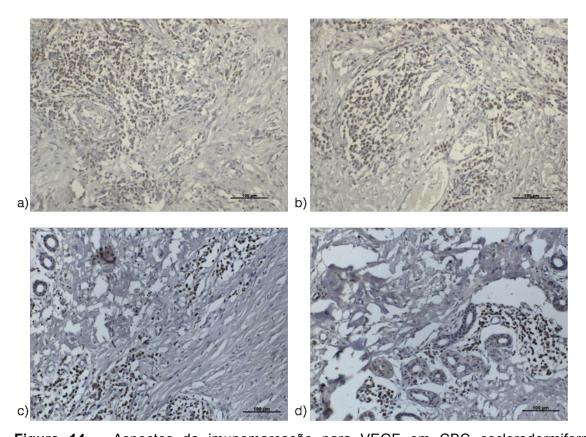


Figura 14 – Aspectos da imunomarcação para VEGF em CBC esclerodermiforme e micronodular:
 (a) Presença de infiltrado inflamatório composto por linfócitos, com marcação efetiva do anticorpo anti-VEGF na maioria destas células (100x); (b) Processo inflamatório com mesmo aspecto de marcação que o anterior (100x); (c) Processo inflamatório peri-tumoral (200x); (d) Processo inflamatório peri-tumoral se estendendo a glândulas sudoríparas adjacentes (200x).

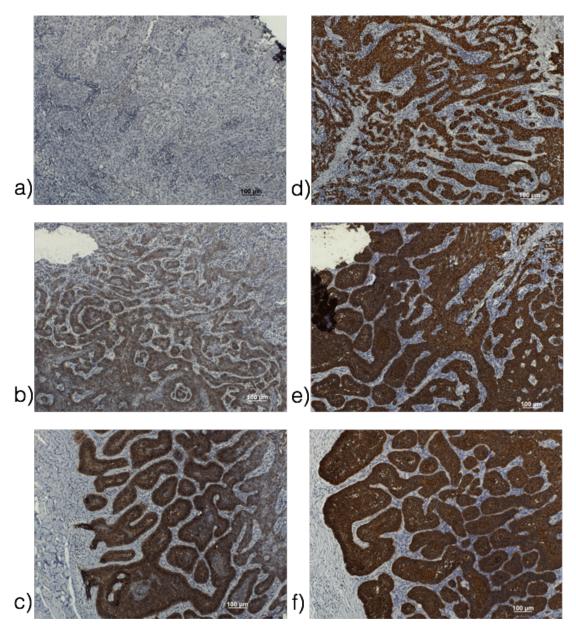


Figura 15 – Aspectos histológicos e da imunomarcação para Ber-EP4 e MNF116 em CBC esclerodermiforme:

(a) Marcação de Ber-EP4 na região mais superficial do tumor mostrando marcação praticamente negativa (100x); (b) Ber-EP4 com marcação tumoral fraca e discretamente heterogênea, sendo negativa na proximidade da epiderme e progressivamente mais intensa nos planos profundos (100x); (c) Ber-EP4 também mostrando progressão da marcação conforme profundidade aumenta, tendo marcação intensa e homogênea na região tumoral na derme profunda (100x); (d) Marcação com MNF116 intensa e homogênea em todo tumor, desde região superficial até a profunda (100x); (e) MNF116 com marcação tumoral intensa e homogênea (100x).

Como citado anteriormente, por meio do método proposto e auxílio do software Image J, realizou-se a análise e mensuração da intensidade e do porcentual 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 para 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 da escala de cinza – que vai de 0 a 255 – e 85% do valor da escala dos tumores – máximo dos tumores é 150), para quantificar o percentual de células marcadas na reação IHQ [Figuras 16 a 19].

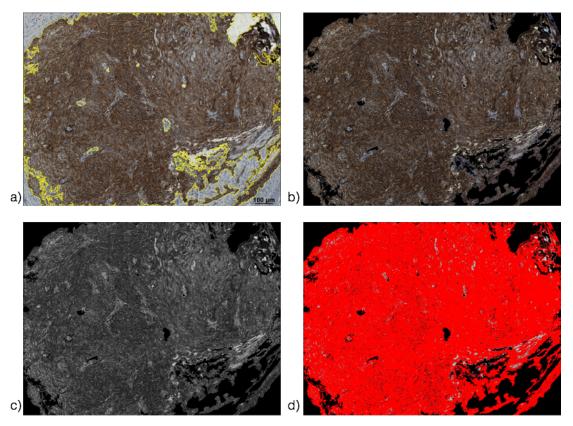


Figura 16 – Análise no software Image J para mensuração da intensidade de marcação e porcentual de células marcadas pela IHQ.

(a) CBC nodular corado pelo Ber-EP4 e demarcado pelo software; (b) Remoção do background para análise restrita da área tumoral; (c) Conversão da imagem para 8-bits e análise na escala de cinza; (d) Análise do limiar (threshold) para quantificação de células marcadas pelo Ber-EP4.

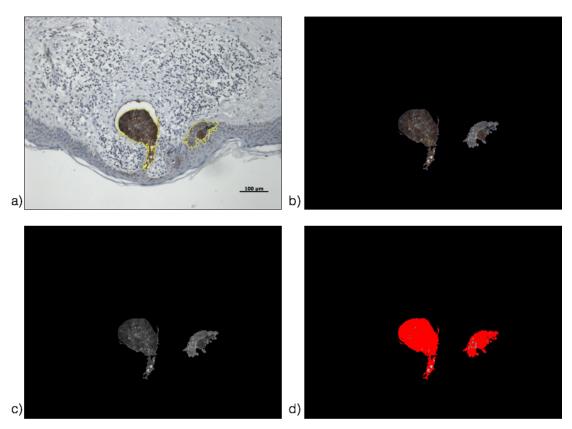


Figura 17 – Análise no software Image J para mensuração da intensidade de marcação e porcentual de células marcadas pela IHQ.
 (a) CBC superficial corado pelo Ber-EP4 e demarcado pelo software; (b) Remoção do background para análise restrita da área tumoral; (c) Imagem em 8-bits para análise na escala de cinza. (d) Análise do limiar (threshold) para quantificação de células marcadas pelo Ber-EP4.

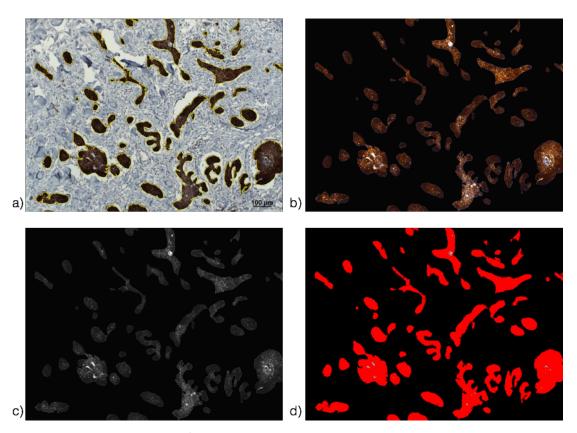


Figura 18 – Análise no software Image J para mensuração da intensidade de marcação e porcentual de células marcadas pela IHQ.
(a) CBC esclerodermiforme corado pelo Ber-EP4 e demarcado pelo software;
(b) Remoção do background para análise restrita da área tumoral; (c) Imagem em 8-bits para análise na escala de cinza; (d) Análise do limiar (threshold) para quantificação de células marcadas pelo Ber-EP4.

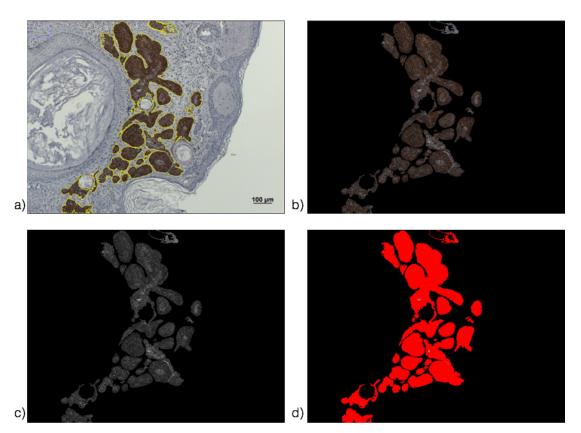


Figura 19 – Análise no software Image J para mensuração da intensidade de marcação e porcentual de células marcadas pela IHQ.
(a) CBC micronodular corado pelo Ber EP4 e demarcado pelo software; (b) Remoção do background para análise restrita da área tumoral; (c) Imagem em 8-bits para análise na escala de cinza. (d) Análise do limiar (threshold) para quantificação de células marcadas pelo Ber-EP4.

4.3.1 Imunomarcação com Ber-EP4

Os resultados de cada anticorpo serão demonstrados dividindo-se em intensidade de marcação, porcentagem de área marcada e escore, que resulta da multiplicação dos dois primeiros fatores (intensidade x % área). Eles também foram divididos em resultados dos quatros tipos histológicos e, posteriormente, nos grupos não agressivos e agressivos.

Como previamente descrito, a imunomarcação do anticorpo Ber-EP4 foi considerada acentuada e com padrão homogêneo em todos os tipos histológicos de CBC. Os valores médios da intensidade de marcação variaram entre 62,8 a 82,13, e observou-se valores menores no CBC nodular comparado ao do esclerodermiforme (62,82 x 82,13; p= 0,04, ANOVA) [Gráfico 7a]. Os valores

médios de intensidade de marcação nos grupos não agressivos e agressivos, 70,9 e 80,7, respectivamente, não mostraram significância estatística [Gráfico 7b].

Os valores percentuais médios de área marcada pelo Ber-EP4 nos quatro tipos histológicos variou entre 88,1% a 97%, e o valor percentual médio de área marcada do CBC superficial foi superior comparado ao do nodular (97% x 88,1%; p= 0,05, Kruskal-Wallis) e à do micronodular (97% x 88,3%; p= 0,05, Kruskal-Wallis) [Gráfico 7c]. Os percentuais médios da área marcada nos CBC agressivos e não-agressivos (92,4% e 92,1%, respectivamente) não mostraram diferenças estatisticamente significantes [Gráfico 7d].

Na comparação entre os escores (intensidade x % área) obtidos com a marcação Ber-EP4, notou-se uma distribuição de valores semelhante à intensidade de marcação, com valores médios variando entre 58,49 a 78,54 nos quatro subtipos histológicos. O escore médio do CBC nodular foi inferior comparado ao esclerodermiforme (58,49 x 78,54; p= 0,04, ANOVA) [Gráfico 7e]. Os valores médios dos escores dos CBC agressivos versus não-agressivos (76,75 x 67,64, respectivamente), não mostraram diferenças estatisticamente significantes [Gráfico 7f].

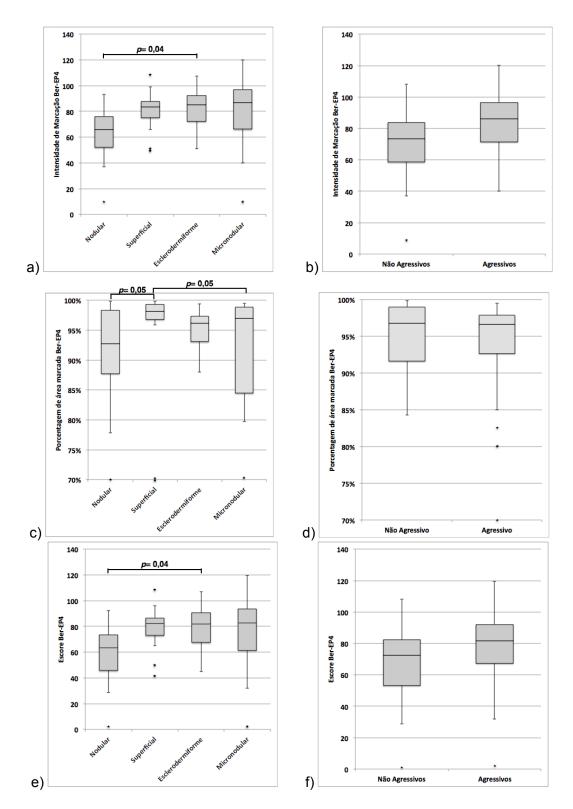


Gráfico 7 — Comparação marcação imuno-histoquímica por Ber-EP4 nos subtipos do carcinoma basocelular:

Intensidade nos quatro subtipos histológicos (a) e nos subtipos não agressivos e agressivos (b); **Percentual** de área nos quatro subtipos histológicos (c) e nos subtipos não agressivos e agressivos (d); **Escore** nos quatro subtipos histológicos (e) e nos subtipos não agressivos e agressivos (f).

4.3.2 Imunomarcação com MNF116

A análise para o anticorpo MNF116 mostrou padrões semelhantes ao Ber-EP4 em relação à intensidade, com a marcação acentuada e homogênea das células tumorais em todos os subtipos do CBC. Nota-se que o MNF116 marca epiderme.

Entretanto, notou-se menor valor de intensidade de marcação no CBC nodular comparada ao do esclerodermiforme (74,22 x 90,95; p= 0,008, ANOVA) e ao do micronodular (74,22 x 93,56; p= 0,005, ANOVA) [Gráfico 8a]. Os valores médios de intensidade nos CBC agressivos *versus* não-agressivos (78,5 e 92, respectivamente), também mostram diferenças estatisticamente significantes (p= 0,001, teste t) [Gráfico 8b].

Os valores percentuais de área imunomarcada pelo MNF116 nos quatro subtipos histológicos variaram de 91,13% a 97,19%. O CBC micronodular mostrou maior valor percentual de área marcada comparado ao nodular (97,19% x 91,13%; p= 0,02, Kruskal-Wallis) e ao esclerodermiforme (97,19% x 95,9%; p= 0,04, Kruskal-Wallis) [Gráfico 8c]. Os valores percentuais médios das áreas marcadas nos agressivos *versus* não-agressivos, 92,6% e 96,4%, respectivamente, não mostraram diferenças com significância estatística [Gráfico 8d].

Os escores médios obtidos com marcação MNF116 variou de 69,3 a 91, e indicou valor inferior no CBC nodular comparado ao do esclerodermiforme (69,2 x 87,3; p= 0,01, ANOVA) e ao do micronodular (69,2 x 91; p= 0,005, ANOVA) [Gráfico 8e]. Na comparação, o valor médio dos escores dos CBC agressivos foi superior ao dos não-agressivos (88,8 x 74,0, p= 0,001; teste t) [Gráfico 8f].

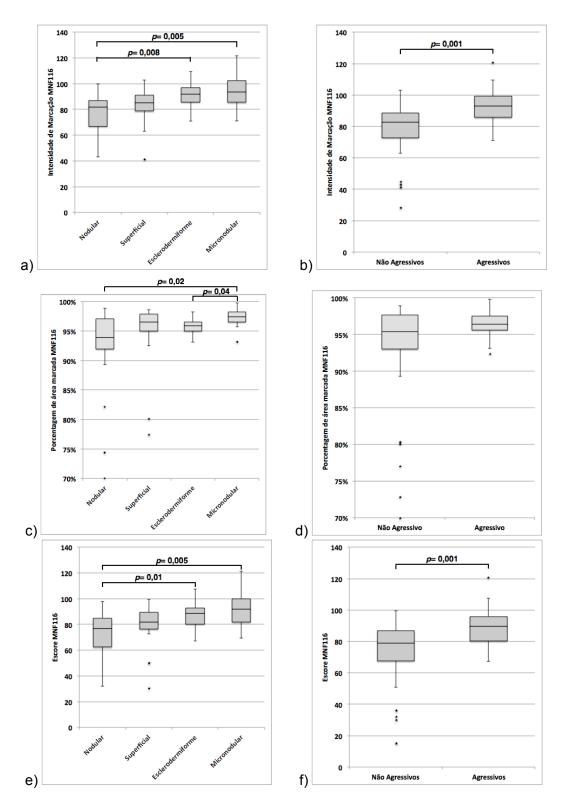


Gráfico 8 – Comparação da marcação imuno-histoquímica por MNF116 nos subtipos do carcinoma basocelular:

Intensidade nos quatro subtipos histológicos (a) e nos subtipos não agressivos e agressivos (b); **Percentual** de área nos quatro subtipos histológicos (c) e nos subtipos não agressivos e agressivos (d); **Escore** nos quatro subtipos histológicos (e) e nos subtipos não agressivos e agressivos (f).

4.3.3 Imunomarcação com E-Caderina

Os valores obtidos na mensuração de intensidade de marcação nos quatro tipos histológicos para o anticorpo E-Caderina foram inferiores comparados aos outros anticorpos (Ber-EP4 e MNF116), com variação de médias de 20,56 a 34,78. O valor médio da intensidade do CBC superficial foi superior comparado aos demais subtipos, no entanto, apenas estatisticamente diferente quando comparado ao do nodular (34,78 x 20,56; p= 0,02, ANOVA) [Gráfico 9a]. Os valores médios dos CBC agressivos e não-agressivos, 25,7 e 27, respectivamente, não mostraram diferenças estatisticamente significantes [Gráfico 9b].

Os valores percentuais de área imunomarcada pela E-Caderina variou de 48,74% a 67,57%. Novamente, o CBC superficial mostrou maior valor percentual médio de marcação de área comparado ao do nodular (67,57% x 48,74%; p= 0,05, ANOVA). Os valores percentuais médios do esclerodermiforme e micronodular foram, respectivamente, 49,58% e 58,3% [Gráfico 9c]. Os valores percentuais médios dos CBC não-agressivos e agressivos (57,35% e 53%, respectivamente) não mostraram diferenças estatisticamente significantes [Gráfico 9d].

Na comparação entre os escores médios obtidos com a marcação com a E-Caderina, notou-se uma distribuição de valores semelhantes à intensidade de marcação nos quatro tipos histológicos, com valores variando entre 11,97 a 25,77, e inferiores aos demais anticorpos. O valor do escore do CBC superficial foi superior ao do CBC nodular (25,77 x 11,97; p= 0,03, ANOVA) [Gráfico 9e]. Os valores médios dos escores agressivos versus não-agressivos (16,94 e 18,28, respectivamente), não mostraram diferenças estatisticamente significantes [Gráfico 9f].

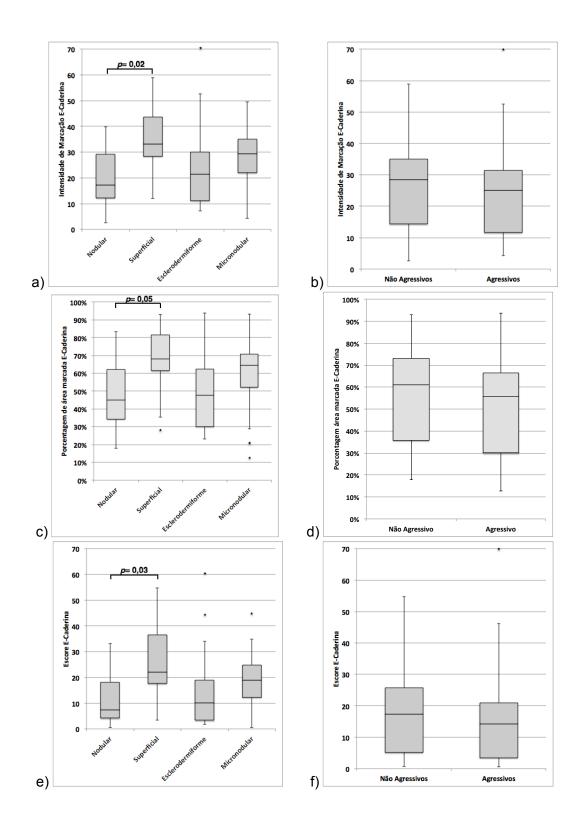


Gráfico 9 – Comparação da marcação imuno-histoquímica por E-Caderina nos subtipos do carcinoma basocelular:

Intensidade nos quatro subtipos histológicos (a) e nos subtipos não agressivos e agressivos (b); **Percentual** de área nos quatro subtipos histológicos (c) e nos subtipos não agressivos e agressivos (d); **Escore** nos quatro subtipos histológicos (e) e nos subtipos não agressivos e agressivos (f).

Os valores médios da intensidade, do percentual de área marcada e dos escores obtidos com Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina nos quatro subtipos histológicos e nos CBC agrupados em agressivos e não agressivos estão sumariados na tabela 20.

Tabela 20 – Valores médios da intensidade, percentuais de área marcada e escores obtidos com Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina nos diferentes subtipos histológicos do carcinoma basocelular.

	MARCADORES			
	BER-EP4	MNF116	E-CADERINA	
INTENSIDADE (valor médio)				
Nodular	62,82 ^a	74,22 ^{b, c}	20,56 ^d	
Superficial	80,51	83,62	34,78 ^d	
Esclerodermiforme	82,13 ^a	90,95 ^b	24,34	
Micronodular	78,52	93,56 ^c	27,70	
Agressivos	80,69	92,0 ^e	25,69	
Não agressivos	70,91	78,52 ^e	27,06	
				
PERCENTUAL DE ÁREA MARCADA (valor médio)				
Nodular	88,1 ^f	91,13 ^g	48,74 ⁱ	
Superficial	97,01 ^f	94,45	67,57 ⁱ	
Esclerodermiforme	95,1	95,92 ^h	49,58	
Micronodular	88,3 ^f	97,19 ^{g,h}	58,3	
Agressivos	92,38	96,43	16,94	
Não agressivos	92,17	92,65	18,28	
ESCORE (valor médio)				
Nodular	58,49 ^j	69,28 ^{k, l}	11,97 ^m	
Superficial	78,51	79,74	25,77 ^m	
Esclerodermiforme	78,54 ^j	87,31 ¹	15,39	
Micronodular	74,05	91,03 ^k	19,26	
Agressivos	76,75	88,80 ⁿ	16,94	
Não agressivos	67,64	74,06 ⁿ	18,28	

Teste ANOVA: a p= 0,04; b p= 0,008; c p= 0,005; d p= 0,02; i p= 0,02; j p= 0,04; k p= 0,005; l p= 0,01; m p= 0,03 Teste Kruskal-Wallis: f p= 0,05; g p= 0,02; h p= 0,04

Teste t: e p= 0,001; n p= 0,001

4.3.3 Imunomarcação com VEGF

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 percentual 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 nodular [Gráfico 10a] e acentuada nos tumores agressivos [Gráfico 10b]. Não foram observadas diferenças nos valores absolutos médios de células inflamatórias peritumorais nos diferentes subtipos de CBC (p= 0,12; ANOVA); e quando comparados os grupos agressivos e não agressivos (p= 0,14; Teste t).

A marcação de células inflamatórias peritumorais pelo anticorpo VEGF mostrou-se com intensidade leve nos subtipos superficiais, e intensidade leve a moderada nos subtipos nodulares. Já nos subtipos micronodular esclerodermiforme a intensidade da marcação das células do infiltrado PT foi considerada intensa [Gráfico 10c]. A análise estatística mostrou maior marcação do VEGF no esclerodermiforme em comparação ao nodular (33,86% x 16,48%; p= 0,003; ANOVA) e ao superficial (33,86% x 10,94%; p< 0,001; ANOVA). Ainda, o subtipo o micronodular mostrou com maior marcação do VEGF comparado ao superficial (26,55% x 10,94%; p= 0,04; ANOVA). Na comparação, o percentual de células marcadas pelo VEGF foi superior nos tumores agressivos comparados aos não agressivos [Gráfico 10d], com significância estatística (p< 0,001; teste t).

A tabela 21 resume as médias e desvio padrão do total de células inflamatórias peritumorais e da porcentagem de células marcadas pelo VEGF.

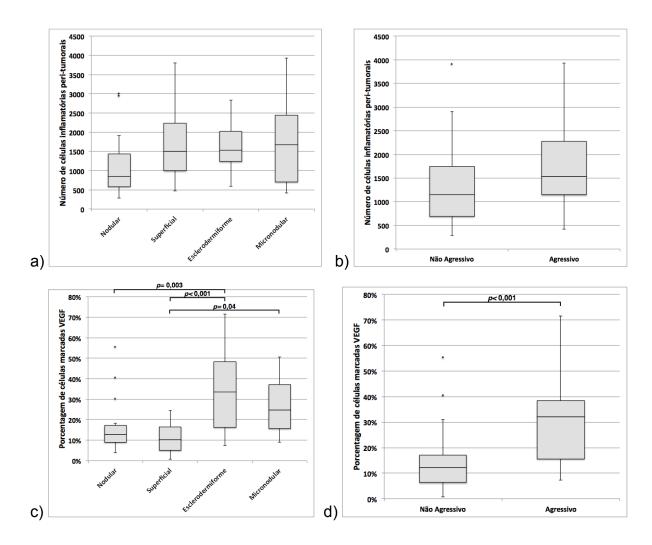


Gráfico 10 – Gráficos box-plot da contagem de células inflamatórias peritumorais e da porcentagem de imunomarcação de VEGF:
(a) Comparação do número total de células inflamatórias peritumorais nos diferentes subtipos de CBC (p= 0,12; ANOVA). (b) Comparação do número total de células inflamatórias peritumorais nos grupos não agressivos e agressivos (p= 0,14; Teste t). (c) Porcentagem de células imunomarcadas pelo VEGF nos diferentes subtipos de CBC. (d) Porcentagem de células imunomarcadas pelo VEGF nos grupos não agressivos e agressivos (p< 0,001; Teste t).

Tabela 21 - Tabela de médias e desvio padrão da contagem do total de células inflamatórias e da porcentagem de células marcadas com VEGF na região peri-tumoral nos tipos histológicos de CBC e nos grupos não agressivo (nodular e superficial) e agressivo (esclerodermiforme e micronodular)

	MÉDIA DO TOTAL DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS PERI-TUMORAIS	PORCENTAGEM DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS MARCADAS COM VEGF (%)
NODULAR <i>Média (± DP)</i>	1126 (± 757)	16,4 (± 13) ^a
SUPERFICIAL <i>MÉDIA (± DP)</i>	1682 (± 916)	10,9 (± 7,7) ^{b, c}
ESCLERODERMIFORME <i>MÉDIA</i> (± <i>DP</i>)	1645 (± 617)	33,8 (± 19,7) ^{a, b}
Micronodular <i>Média (± DP)</i>	1782 (± 1159)	26,5 (± 14,4) ^c
NÃO AGRESSIVOS MÉDIA (± DP)	1380 (± 868)	13,9 (± 11,1) ^d
AGRESSIVOS MÉDIA (± DP)	1700 (± 859)	30,9 (± 17,9) ^d

Teste ANOVA: ^a p= 0,003; ^b p< 0,001; ^c p= 0,04; ^d p< 0,001

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

As neoplasias cutâneas não-melanoma (NCNM) são as formas de câncer mais comuns da população branca (Diepgen e Mahler, 2002; Lear, Dahlke e Murray, 2007), sendo a grande maioria representada pelo carcinoma basocelular (CBC).

As NCNM são responsáveis por baixa mortalidade, entretanto, as suas elevadas taxas de incidência implicam em significativo impacto e ônus aos sistemas de saúde e aos indivíduos (Breitbart, Greinert e Volkmer, 2006).

A despeito do seu crescimento lento e baixo potencial metastático, o CBC pode evoluir com substancial invasão e destruição local, e o tratamento cirúrgico é ainda o de primeira eleição. O sucesso do tratamento é aquele com elevadas taxas de cura e baixas de recorrência do tumor, e que evita reintervenções (Griffiths, 1999).

Frente à expressiva prevalência de casos de CBC nos serviços especializados de saúde e a necessidade da avaliação do potencial sucesso do tratamento cirúrgico, a análise do comprometimento das margens cirúrgicas ou a completa excisão do tumor pode ser um interessante indicador para mensurar a resolubilidade e a qualidade do tratamento para as NCNM. Há uma negativa correlação entre uma excisão com margens livres e a probabilidade de recorrência (Thomas et al, 2003; Riml et al, 2012). A literatura registra taxas de incompleta excisão entre 5% e 25%. Em acordo com a meta-análise de Gulleth e colaboradores, a amostra de 16.066 CBC mostrou a taxa de 14% de incompleta incisão, com o achado de margens cirúrgicas negativas variando de 45% a 100%, média de 86% ± 12% (Gulleth et al., 2010).

O tratamento cirúrgico convencional, diferente do destrutivo ou medicamentoso, permite a avaliação histológica das margens cirúrgicas e atinge ambas altas taxas de cura (95% a 99%) e baixa de recorrência quando as margens são negativas (entre 1% a 14%) (Dieu; Macleod, 2002; Codazzi et al, 2014)

Em geral, a maioria dos autores recomenda para o CBC margens laterais clinicamente não envolvidas entre 3 a 5 mm, mas as taxas de cura podem declinar no manuseio de tumores de maiores dimensões, subtipos agressivos e tumores em localizações específicas (Rubin et al, 2005; Thomas et al; 2003)

A excisão incompleta varia entre 7 a 25% (Dieu; Macleod, 2002; Gulleth et al., 2010) e a verdadeira recorrência seguida da excisão incompleta, varia amplamente entre 26% a 67% (Farhi et al 2007). Em acordo com a Sociedade Americana de Câncer, a taxa de recorrência é mais frequente nos primeiros 5 anos após o tratamento, sendo recomendada visitas de seguimento a cada 6 a 12 meses ao longo de toda vida (American Cancer Society, 2012).

No seguimento, as taxas de recorrência de tumores incompletamente excisados são variáveis (26% a 67%) (Farhi et al 2007). Embora, a recorrência seja muito variável, tais dados revelam um aumento substancial do risco de CBC incompletamente excisados. Adicionalmente, quando os CBC recorrem, eles são frequentemente maiores no momento da descoberta comparados ao seu tamanho inicial e, em geral, exigem cirurgias mais complexas e são mais difíceis para serem erradicados. As taxas de cura para CBC recorrentes são piores quando comparados àqueles não tratados previamente. Portanto, o significado de uma excisão incompleta de um CBC indica significativamente um maior risco de recorrência, e implica em maiores dificuldades para a sua erradicação (Fleischer et al, 2001).

A adoção de conduta expectante e conservadora pode ser excepcionalmente aceitável em alguns casos de margens cirúrgicas positivas, como por exemplo, após a excisão de CBC em localizações de baixo risco ou para tumores classificados com baixa agressividade, em pacientes com avançada idade e/ou com várias comorbidades (Bassas et al, 2013). No entanto, a excisão incompleta de CBC na face resulta em significativa comorbidade, se a conduta expectante é adotada ao invés da decisão da re-excisão imediata (Salmon et al, 2010). Vale ressaltar que a incisão incompleta implica em aumento da demanda nos serviços de assistência especializada e dos custos de um segundo procedimento, em geral de maior complexidade.

Atualmente, no Ambulatório de Dermatologia Oncológica e Cirúrgica do HCFMRP-USP adota-se a cirurgia como primeira escolha para quase totalidade dos CBC, é excepcional a indicação de tratamentos alternativos, como o uso do imiquimode. A curetagem e eletrocoagulação e a crioterapia não tem sido empregadas e a terapia fotodinâmica não tem sido indicada para tratamento de tumores (CBC e disceratose de Bowen) desde 2009, em decorrência da limitação da indicação para o subtipo superficial, dos custos e da inferioridade dos resultados clínicos (Felício et al, 2008; Souza et al, 2009).

Na amostra do estudo, foi observada predominância do sexo masculino (60,4%) em concordância com maioria dos registros da literatura, em que se denota a população masculina ser preferencialmente acometida pela neoplasia (Lear, Dahlke e Murray, 2015; Dreier et al., 2014). No entanto, séries mais recentes têm indicado uma ascensão da incidência da neoplasia no sexo feminino (Christenson *et al.*, 2005; Jurciukonyte et al., 2013; Asgari et al., 2015; Marzuka e Book, 2015).

No estudo, o encontro do comprometimento das faixas etárias mais avançadas, a partir da quinta década, está em plena consonância com a literatura mundial (Schäfer et al., 2014). Apenas 2% (14 casos) da nossa amostra de indivíduos estavam abaixo de 40 anos, e o acometimento de indivíduos mais jovens pela neoplasia tem chamado atenção (Karagas et al., 2014). Não obstante, os registros da literatura indicam que as mulheres têm apresentado tumores em idades mais precoces (Reinau et al., 2014; Arnspang et al., 2015).

Na amostra (n= 674) de CBC excisados no HCFMRP-USP, serviço de saúde de alta complexidade está representada a atuação de diversas especialidades, suas respectivas equipes médicas de variada formação e níveis de experiência, em conjunto com os médicos residentes em treinamento, no tratamento das neoplasias cutâneas. Neste contexto, pudemos explorar vários fatores que pudessem estar envolvidos no comprometimento das margens cirúrgicas do CBC.

Nossos resultados evidenciaram expressivo predomínio topográfico do segmento cefálico (71%), comparado ao não-cefálico, o que é corroborado por inúmeros registros na literatura e estabelece a forte relação com áreas de exposição à radiação ultravioleta (RUV) (Jurciukonyte et al., 2013; Stoica et al., 2009; Wehner et al., 2015), e a distribuição anatômica do CBC é consistente com os níveis de exposição solar das áreas do corpo (Richmond-Sinclair et al. 2009).

Adicionalmente, o achado da neoplasia nos membros inferiores no sexo feminino é justificado, de um modo geral, pelo aumento da exposição destas áreas pelas mulheres (Wu et al., 2013).

Ainda, nossos achados sugeriram que a idade possa estabelecer relação com a localização da neoplasia, pois na comparação entre idade categorizada mostrou que em pacientes mais jovens (< 73 anos), há predominância de CBC no tronco comparado ao segmento cefálico (*p*= 0,001). Em concordância com a literatura, indivíduos mais jovens parecem exibir uma prevalência do CBC

maior no tronco e mais baixa no segmento cefálico (Neale et al., 2007; Betti et al., 2009).

A maior exposição dos indivíduos à RUV é resultante mudanças dos hábitos sociais e culturais, que implicou no aumento da exposição solar recreacional, além do ocupacional, e nas mudanças das vestimentas com maiores áreas do tegumento expostas à RUV (Xiang et al., 2014); e ainda, da ocupação crescente das mulheres nos segmentos de trabalho, em particular o rural, ao longo dos anos. Tais fatores seriam responsáveis pelo aumento da incidência das neoplasias cutâneas nas mulheres e nos mais jovens, e possivelmente pelas particulares diferenças de localização da neoplasia entre os sexos (Pranteda et al., 2014; Rudolph et al., 2015).

Ainda no estudo, foi notada a prevalência significativa do subtipo nodular (61%) do CBC, seguido do superficial (14%), ambos considerados de baixo risco. Já os subtipos de alto risco somados perfizeram 25% da amostra (micronodular, esclerodermiforme, infiltrativo e basoescamoso). Tal distribuição dos subtipos histológicos é concordante com a literatura (Di Stefani et al., 2015). Vale notar que qualquer proposta de tratamento deva atender e priorizar aquele de maior prevalência ou seja, o CBC nodular, e ainda que um quarto dos CBC diagnosticados são considerados de alto risco e merecem atenção quanto a sua abordagem de tratamento.

Na busca da identificação dos potenciais fatores envolvidos no comprometimento das margens cirúrgicas, foi inicialmente identificado que a idade possa ter relevância. Uma análise preliminar indicou que indivíduos mais jovens (<40 anos) apresentavam elevada frequência (94%) de margens livres, contra a de 86% nos mais idosos (>80 anos) (dados não mostrados).

Uma vez observada a média de idade de 68 anos, vale ressaltar que a população mais acometida merece atenção quanto uma potencial redução das chances de sucesso do seu tratamento, e aumento de comorbidades. A média de idade em estudo australiano (n=5044), em sua maioria de homens (58,6%), para a primeira excisão de um CBC é de cerca 10 anos menos, 58,3 anos (Raash et al, 2006). Já em uma série da Espanha, a média de idade de pacientes submetidos à excisão de CBC (n=750) foi de 73 anos (Bassas et al, 2013).

Na sequência, buscamos explorar por meio de várias análises outras variáveis relacionadas ao CBC excisado, quanto às potenciais diferenças entre os sexos e as faixas etárias.

Nossos resultados evidenciaram o sexo masculino apresentou CBC de maior diâmetro (p< 0,001) e mais frequentemente ulcerado (p= 0,003), mas não diferiu quanto aos subtipos histológicos (p= 0,11).

Embora, a presença de ulceração predominasse nos indivíduos mais idosos (> 73 anos) (*p*< 0,001), não foi observada correlação entre tamanho tumoral (medido em seu maior diâmetro) e idade.

A ulceração pode ser interpretada como resultante do crescimento vertical do tumor (acima da superfície da pele ou em planos profundos) não correspondente ao suprimento de neoangiogênese para a sua sustentação, e um indicativo do aumento da sua capacidade invasão local (Vuletic et al., 2014).

O atraso ou negligência na busca aos serviços de saúde dos homens para a resolução deste agravo pode ser a causa do encontro de tumores de com maior tempo de evolução (maiores dimensão e presença de ulceração). Em adição à negligência, negação, receio ou desinformação, a redução da imunovigilância nos indivíduos mais idosos seria uma possível causa da maior frequência de ulceração nos tumores excisados (Yu, Bordeaux e Baron, 2014).

A despeito destes fatores potencialmente desfavoráveis ao sucesso do tratamento, por meio da análise univariada da amostra, foi indicado que os fatores sexo e idade categorizada (73 anos) não mostraram relação com o comprometimento das margens cirúrgicas (p= 0,83 e p= 0,19, respectivamente). Deve ser considerado que outros fatores estariam prevalecendo para superar estes potenciais obstáculos.

Por outro lado, a equipe deve estar atenta e habilitada cirurgicamente para o manuseio de lesões com maiores diâmetros e ulceradas no sexo masculino e no indivíduo idoso, para garantir o sucesso do tratamento.

Ainda, no estudo há evidências que os grupos risco para a neoplasia são os homens e indivíduos mais velhos, que são de extrema valia para o planejamento das estratégias de prevenção (Souza, 2015).

Em seguida, buscamos identificar os fatores relacionados à neoplasia que pudessem estar envolvidos no comprometimento das margens cirúrgicas.

Inicialmente, observamos que os CBC do subtipo nodular foram predominantes no segmento cefálico (p< 0,001) e nos membros (p< 0,001) comparado ao tronco. Inversamente, o subtipo superficial é predominante no tronco comparado ao segmento cefálico (p< 0,001) e aos membros (p< ,001). Há vários

estudos ao redor do mundo e em diferentes amostras populacionais ou grupos étnicos indicando o tronco como sítio preferencial do CBC superficial, a exemplo dos estudos na Itália (Betti et al, 2009) e em Taiwan (Chen; Chen; 2006). Raasch e colaboradores (2006) observaram para todos os subtipos e em ambos os gêneros, uma maior densidade de CBC na face seguida do pescoço. Uma exceção, foi observada nos homens, nos quais o subtipo superficial no tronco de homens ocupou a segunda posição, seguido do pescoço. Neale e colaboradores (2007) sugerem que o surgimento de CBC no tronco é resultado da exposição excessiva à RUV de células basais sensíveis da epiderme, o que resultar de intensas exposições agudas suficiente para causar queimadura entre as pessoas com habilidade para o bronzeamento da face, geralmente menos susceptível aos efeitos carcinogênicos da RUV.

Os tumores do tronco mostraram maiores dimensões comparado aos do segmento cefálico (p< 0,001). Mas foi interessante notar que o diâmetro dos tumores não se correlacionou à presença de ulceração, aos tipos histológicos (p = 0,97) e à idade (p= 0,24). Nossos achados são concordantes com aqueles da série de Chen e Chen (2006), em que o subtipo superficial mais frequento no tronco, também com maiores dimensões.

No entanto, a presença de ulceração predominou nos subtipos nodulares, e naqueles localizados no segmento cefálico e nos membros comparados aos do tronco. Em concordância com a literatura, o subtipo superficial foi com menor frequência associado à ulceração (Mina et al., 2013).

Nos indivíduos abaixo de 73 anos, houve predomínio do subtipo superficial comparado ao nodular (p=0,02) e ao esclerodermiforme (p<0,001). Tais resultados são concordantes com aqueles observados por Bozan e colaboradores (2015), em que os pacientes mais jovens mostraram com maior prevalência de tumores no tronco e do subtipo superficial.

Por meio da análise univariada, a localização revelou ser fator determinante para o comprometimento das margens cirúrgicas, sendo o segmento cefálico de maior risco comparado ao tronco (OR 20; p< 0,001) e aos membros (OR 14,29; p< 0,001). Já os tumores no tronco apresentaram menores chances das margens comprometidas, a despeito das maiores dimensões comparados aos do segmento cefálico (p< 0,001).

Uma vez que a localização no segmento cefálico aumenta as chances de margens comprometidas, todos aqueles localizados nesta região merecem atenção e o seu tratamento deve ser conduzido por especialista treinado. Adicionalmente, há áreas de maior risco (zona H) para a qual já está indicada a cirurgia micrográfica (Bozan et al., 2015).

Ainda, o subtipo histológico do CBC também influenciou no desfecho do comprometimento das margens cirúrgicas. Os subtipos micronodular e esclerodermiforme apresentam maior risco para o comprometimento das margens comparados ao nodular (OR 2,93 e OR 2,52; respectivamente, p= 0,02) e ao superficial (OR 26,18 e OR 30,48, respectivamente, p< 0,001). Por outro lado, o subtipo superficial mostrou-se com menor risco para o comprometimento das margens comparado ao nodular (OR 0,10; p= 0,005). Esses dados são condizentes com trabalhos prévios, onde se observou maiores taxas de recidivas nestes tumores considerados agressivos (esclerodermiforme e micronodular) (Cigna et al., 2011; Szewczyk et al., 2014; Alam et al., 2015).

Já na regressão logística binária multivariada foi o subtipo micronodular aquele que apresentou o maior risco do comprometimento das margens cirúrgicas. Nossos resultados sustentam o maior risco deste subtipo para a recidiva, e sendo classificado como *agressivo* há implicações no seu planejamento de tratamento e manuseio cirúrgico. Uma vez que o subtipo micronodular for reconhecido ou identificado, estaria minimamente indicada a cirurgia tradicional com maiores margens de segurança (Lear et al., 2007), ou ideal e precocemente, a cirurgia micrográfica para o aumento das chances de cura (van Loo et al., 2014).

Apesar da presença de ulceração mostrar aumento das chances para o desfecho das margens cirúrgicas comprometidas na análise univariada (OR 2,43; *p*< 0,001), na multivariada não houve significância estatística (p= 0,553). Vale lembrar que a ulceração é mais frequente nos subtipos nodulares, nos indivíduos mais idosos (> 73 anos) e nos indivíduos do sexo masculino e uma atenção a este critério é cauteloso.

Na sequência, buscamos identificar distribuição e as especialidades responsáveis pela excisão dos CBC na nossa amostra do estudo. A Dermatologia foi responsável pela expressiva maioria das cirurgias com 78% dos casos, seguida da CCP (11%), Oftalmologia (5%), Cirurgia Plástica (4%) e outras especialidades não especificadas (2%). Tais resultados corroboram a significativa participação da

especialidade e do serviço dentro da instituição na resolução de afecção de elevada prevalência, significativa morbidade e elevado impacto econômico no sistema de saúde.

Uma vez que a especialidade Dermatologia foi detentora do maior número de CBC excisados na instituição, foi relevante estabelecer a capacidade resolutiva da equipe e o índice de sucesso medido por meio da frequência de margens livres. Os resultados revelaram que o índice de margens livres para a Dermatologia foi o mais elevado, com 95%, seguido da Cirurgia Plástica (89%), já a CCP e Oftalmologia mostraram baixos índices de margens livres (60% e 49%, respectivamente).

O índice geral de margens comprometidas na remoção de CBC por todas as especialidades que atuam na instituição para foi de 25,4%. A despeito dos índices da instituição se encontrarem nos limites superiores comparados àqueles observados na literatura, entre 5% e 25% (média de 14%) de incompleta incisão (Gulleth et al., 2010), a especialidade Dermatologia se posicionou com os menores índices (5%) da instituição comparáveis àqueles registrados na literatura, e em concordância com diversos estudos realizados em centros de assistência ao redor do mundo, como apresentados a seguir.

Um estudo multicêntrico de quatro centros universitários americanos publicado por Fleischer e colaboradores (2001) mostrou que Dermatologistas foi o grupo que apresentou menor probabilidade de realizar excisão incompleta (margens comprometidas), comparados aos Otorrinolaringologistas e Cirurgiões Plásticos e concluíram que a especialidade médica pode afetar a qualidade de assistência no manuseio cirúrgico do CBC. Neste estudo foram analisados 1459 espécimes excisadas, a presença de margens comprometidas foi observada em 16,6% da amostra, com a menor índice obtido pelos dermatologistas (14,2%) seguido por cirurgiões gerais (17,9%), cirurgiões plásticos (27,6%), e otorrinolaringologistas (46,9%).

Na Nova Zelândia, dermatologistas foram comparados com médicos clínicos gerais (*general practitioners* - GP) no trabalho de Salmon e colaboradores (2010). No total de 1532 lesões excisadas (1100 malignas e 432 benignas). Entre aquelas excisadas por dermatologistas 93% eram malignas, 55% da região da cabeça e pescoço, e nenhuma incisão incompleta. Já entre os GP, 63% lesões malignas, 30% da cabeça e pescoço e 23% de excisão incompleta de lesões

malignas. Os autores concluíram que os GP excisaram mais lesões benignas e tiveram maiores taxas de excisão incompleta para as lesões malignas comparados aos dermatologistas. Aas taxas de excisão incompleta avariou entre 0% a 45% dependendo do grupo e da localização da lesão. Os custos aumentam substancialmente se um significante número de lesões benignas é excisado ou se uma excisão primária é incompleta.

Na Espanha, Bassas e colaboradores (2013) determinaram as taxas de margens positivas de CBC removidos por cirurgiões de diferentes especialidades. Na mostra de 921 tumores, o índice de margens comprometidas foi de 13%. Dermatologistas excisaram 59,6% dos tumores, seguidos por cirurgiões plásticos (21,5%), cirurgiões gerais (15,5%), outros especialistas (oftalmologistas, cirurgiões maxilofaciais, otorrinolaringologistas) removeram apenas 30 tumores (3,3%). Em concordância com os estudos prévios e nossos resultados, as margens positivas foi identificada em 6,7% dos tumores excisados por dermatologistas e em 21,5% daqueles removidos por não dermatologistas, taxas de 19,3% para cirurgiões plásticos, 22,4% para cirurgiões gerais e 33,3% para outros especialistas. Os autores concluíram que a especialidade médica pode afetar a qualidade de assistência no manuseio cirúrgico do CBC

Vale ainda ressaltar que enquanto instituição de treinamento e ensino pode ser esperada taxas mais elevadas de remoção incompleta dos tumores. Riml e colaboradores (2013) demonstrou que os índices de incisão incompleta diminuíram do primeiro (12,1%) ao terceiro ano (5,7%) de treinamento em cirurgia plástica, a despeito do aumento do nível de complexidade dos tumores removidos. Neste quesito, podemos comparar os baixos níveis daqueles do último ano de treinamento observados por Riml e colaboradores (2013) àqueles obtidos na Dermatologia do HCFMRP-USP (5%), no presente estudo.

Fatores como a idade do paciente, localização, dimensão e subtipo histológico do tumor não explicam as maiores taxas de margens positivas de tumores excisados por cirurgiões não-dermatologistas (Bassas et al, 2013). A maioria dos autores argumentam que a maior habilidade em atingir um acurado diagnóstico clínico e identificar as margens do tumor, o que pode ser difícil de discernir, além do seu maior conhecimento da biologia dos subtipos do CBC poderiam explicar tais achados (Bassas et al, 2013)

Além da identificação clínica à visão desarmada, a dermatoscopia tem auxiliado sobremaneira na delimitação das margens, e o treinamento do dermatologista para ambas as habilidades parece influir no aumento as chances do desfecho em margens livres. 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 e tem sido utilizada na rotina do nosso serviço de dermatologia cirúrgica (Fantini, 2015).

Previamente, Bisson e colaboradores (2002) mostraram em um estudo prospectivo a importância de se preocupar com as margens cirúrgicas do CBC e que o emprego de lupas (aumento de 3,5x) podem fazer diferença para a demarcação e resultados em margens livres nestas cirurgias.

O advento da dermatoscopia pode providenciar maior acurácia da avaliação da verdadeira extensão do tumor e permitir uma estimativa mais precisa das margens cirúrgicas requeridas na excisão, auxiliando a minimizar as taxas de recorrência. A ausência dos critérios dermatoscópicos do CBC pode definir as margens com pele saudável na área perilesional ao tumor. Enquanto a identificação das estruturas pigmentadas é inquestionável, a utilidade da estrutura vascular é questionável (Lallas et al., 2013).

Certamente, restava estabelecer uma análise comparativa da dimensão média dos CBC excisados entre as diversas especialidades, o que resultou nos valores similares para a Dermatologia (274 mm²), Cirurgia Plástica (279 mm²), algo menor na CCP (218 mm²), e o mais reduzido na Oftalmologia (87 mm²).

A tentativa de preservação de tecido sadio e da funcionalidade da região periocular parece influenciar nestes resultados (Koyuncuer et al., 2014). A remoção de CBC da região periocular apresentam índices de margens comprometidas maior que qualquer outra localização, com índices de até 13% contra 5-8% das demais localizações (Griffiths, Suvarna e Stone, 2007; Rumelt et al., 2010; Husein-Elahmed et al., 2014). Tais resultados fortalecem a indicação de técnicas de excelência, como a cirurgia micrográfica de Mohs, nas quais há o controle preciso das margens cirúrgicas, o que se encontra disponível apenas no serviço de Dermatologia (Narayanan, Hadid e Barnes, 2014).

Em atenção aos baixos índices de margens livres na excisão de tumores obtidos pela CCP podem ser em parte justificados pela topografia (cirurgias

exclusivas do segmento cefálico), maior frequência de cirurgias em indivíduos acima de 73 anos (p= 0,05) e de CBC ulcerados comparada à Dermatologia (p< 0,001).

É interessante notar que a frequência dos CBC do subtipo histológico superficial foi superior na Dermatologia em relação à CCP e Oftalmologia. Tal achado pode ser justificado pela maior frequência deste subtipo no tronco e seu diagnóstico realizado por meio da inspeção visual da pele de todo o tegumento. Frente aos seus diagnósticos diferenciais, a identificação precoce ou a suspeição deste subtipo é facilmente feita pelo dermatologista treinado. Ainda, o uso de dermatoscopia pode garantir melhor identificação e delimitação desses tumores, por conseguinte, maior frequência do desfecho com margens livres (Janjua et al., 2012).

Vale notar nossos resultados mostraram que o subtipo superficial apresentou menor risco para o comprometimento das margens cirúrgicas comparado ao nodular. Na literatura, é conhecido o maior risco de recidiva possivelmente pelo não reconhecimento da sua distribuição multifocal, representada pelas suas interligações em rede com pontos da epiderme. Por essa razão, um corte histológico que mostra margens livres pode representar uma área onde o tumor não mostrava sua interligação com o restante da massa tumoral (Codazzi et al., 2014).

Se considerarmos que a ulceração mantém relação com a capacidade invasão do tumor, o conjunto dos nossos resultados mostra que o subtipo superficial do CBC apresenta com menor frequência a ulceração e menor risco para o comprometimento das margens cirúrgicas. No entanto, deve ser considerado que o menor risco para o comprometimento das margens cirúrgicas do subtipo superficial pode ser resultante da soma de habilidades próprias do dermatologista treinado: 1) no reconhecimento precoce quando do exame de toda a pele; 2) no uso do dermatoscópio que aumenta a acurácia do diagnóstico clínico; 3) e que auxilia na delimitação precisa das margens e pontos multifocais do tumor na fase préoperatória, fatores que somados possivelmente aumentaram o sucesso da intervenção cirúrgica realizada pela especialidade, com os maiores índices de margens cirúrgicas livres no quadro geral.

De maneira algo inesperada, a dimensão do tumor não mostrou relação com o comprometimento das margens cirúrgicas pela análise univariada. Inversamente, a dimensão média de tumores com margens livres mostrou-se maior que a média dos tumores com margens comprometidas (266 mm² x 220 mm², respectivamente).

Baseados nestes resultados, sugere-se a hipótese de que CBC com maiores diâmetros foram os superficiais e aqueles localizados no tronco, ambos apresentaram os menores riscos de margens comprometidas, o que corrobora conceitualmente o baixo risco. Dessa forma, apesar de maiores, tais tumores apresentariam maiores taxas de margens livres.

Vale ainda lembrar que o diâmetro médio dos CBC excisados pela Dermatologia não diferiu da Cirurgia Plástica, adicionalmente, a primeira especialidade atingiu os níveis mais elevados de margens cirúrgicas livres, o que pode ser resultante das habilidades clínicas somadas aos investimentos na equipe, estrutura e treinamento cirúrgico dos seus médicos residentes.

Na análise dos marcadores por meio da reação imuno-histoquímica, o anticorpo anti-Ber-EP4 mostrou elevada sensibilidade na marcação das células neoplásicas do CBC, resultando em boa delimitação do tecido tumoral, em concordância com os registros da literatura (Dasgeb et al., 2013).

Uma análise preliminar indicou marcação de elevado percentual das células dos CBC nos vários subtipos, com padrão homogêneo e moderada a acentuada intensidade de imunoprecipitado para o Ber-Ep4 e MNF116, e intensidade moderada para a E-Caderina.

Nossos achados mostraram a imunomarcação com Ber-EP4 acentuada e com padrão homogêneo em todos os subtipos histológicos de CBC. Nesta análise, os valores de intensidade de marcação e escore do CBC nodular foram menores comparados ao do esclerodermiforme (p= 0,04), o que pode sugerir menor expressão desta proteína no CBC nodular. Isoladamente, o percentual de área marcada pelo Ber-Ep4 foi superior no CBC superficial comparado ao nodular e micronodular (p< 0,05), o que é indicativo da sua potencial aplicação para a identificação dos ninhos tumorais deste subtipo. No entanto, as marcações com Ber-Ep4 não diferenciaram os subtipos agressivos dos não agressivos do CBC, o que sugere que o comportamento dos subtipos agressivos (esclerodermiforme e micronodular) não implica na perda de produção desta proteína. O marcador Ber-Ep4 tem sido utilizado no auxílio da diferenciação do CBC com o carcinoma espinocelular (Sellheyer et al., 2013) e do CBC metatípico (Linskey et al., 2013).

O anticorpo anti-MNF116 mostrou marcação semelhante à do anti-Ber-EP4, que foi subjetivamente avaliado como mais homogêneo entre todos os subtipos de CBC. Já os valores de intensidade de marcação, percentual de área marcada e o escore obtidos com o MNF116 sugeriram possível diferenciação entre os CBC agressivos daqueles não agressivos, o que pode indicar algum auxílio nesta discriminação, além da identificação de ninhos de células tumorais em meio à fibrose e infiltrado inflamatório nos subtipos mais agressivos. No entanto, MNF116 é também marcador da epiderme, o que pode dificultar a distinção ou delimitação do CBC superficial (Orchand et al., 2015).

O maior valor percentual de área marcada no CBC micronodular exibido pelo MNF116 comparada ao nodular (p= 0,02) e ao esclerodermiforme (p= 0,04) é indicativo de que este marcador possa auxiliar, em particular, na identificação deste subtipo agressivo do CBC e seu maior risco do comprometimento das margens.

O anticorpo anti-E-Caderina, de modo geral, marcou com menor intensidade comparados aos demais (Ber-Ep4 e MNF116), mas com padrão homogêneo. Os valores superiores (intensidade, percentual de área e escores) da E-caderina no CBC superficial evidenciaram a sua peculiar característica da distribuição dos ninhos de células tumorais, se estendendo ao longo do eixo da epiderme, e eventualmente poderia auxiliar na identificação histológica do crescimento multifocal do tumor. Este padrão pode estar associado ao seu padrão pouco agressivo de crescimento horizontal, raramente evoluindo para ulceração e invasão para planos profundos. Estes marcadores poderiam eventualmente auxiliar na sua delimitação histopatológica, pois a falta da identificação clínica ou histopatológica e, por conseguinte, a sua ressecção incompleta, pode resultar em recidivas (Marzuka et al., 2015). A perda da expressão da E-Caderina nos tumores mais agressivos da mama tem auxiliado nesta discriminação (Fulga et al., 2015; Vanjaka-Rogosic et al., 2014). Baseados nestes achados, buscamos estudar amostras do CBC, um tumor classicamente pouco metastático, mas com capacidade de agressão e invasão locais, e entender um pouco mais tais características.

Em nossos achados, notou-se que a expressão do VEGF (porcentagem de células inflamatórias marcadas) foi menor no subtipo superficial, o que pode manter relação com a sua menor densidade de vasos neoformados, o que poderia ser determinante da sua baixa capacidade de invasão e agressão. Por outro lado, o encontro no estudo de elevado percentual de células marcadas pelo VEGF no infiltrado peritumoral dos tumores agressivos comparados aos não agressivos (p<

0,001) é indicativo do papel desta proteína no comportamento mais invasivo destes subtipos do CBC.

Os estudos prévios de Bowden e colaboradores (2002) na comparação de CBC e carcinomas espinocelulares (CEC) já indicavam a distinção da expressão do VEGF por IHQ, que foi mais frequente e difusa nos CEC e CBC mais agressivos e invasivos.

Nossos resultados vieram a concordar com aqueles observados por Vuletic e colaboradores (2014) observaram a expressão de VEGF por IHQ significativamente menor no subtipo superficial comparado aos demais. A expressão mais elevada foi observada nos subtipos infiltrativos e meta-atípicos, mas sem nenhuma diferença significante entre nodulares e adenóides. A densidade microvascular foi significativamente maior nos subtipos infiltrativo, meta-atípico, nodular e adenóide.

No entanto, nossos achados são indicativos que o subtipo superficial com menores valores de expressão do VEGF por IHQ, seguido do subtipo nodular, e ambos podem ser agrupados como não agressivos, distintamente daqueles agressivos (esclerodermiforme e micronodular) e outros métodos de análise parecem corroborar tais resultados como discutiremos a seguir.

Oh e colaboradores (2003) obtiveram distinção na comparação de CBC agressivos com aqueles não agressivos por meio da análise do mRNA do VEGF, que foi detectado em todas as amostras de CBC. A expressão do VEGF nos tipos agressivos foi 3,5 vezes maior comparada ao daqueles não agressivos, além da significativa correlação dos níveis d e expressão do VEGF e microdensidade vascular.

Na mesma linha, Longini e colaboradores (2003) compararam a densidade microvascular e os níveis de expressão do mRNA do VEGF em CBC e carcinomas espinocelulares (CEC) e observaram que os valores médios de quantificação do cDNA do VEGF permitem distinguir os tumores com elevada expressão daqueles com baixa expressão. Enquanto a maioria dos CBC mostrou baixa expressão, contrariamente os CEC apresentaram níveis mais elevados de expressão do cDNA do VEGF. Adicionalmente, os autores também mostraram uma significante associação da alta densidade da microvasculatura com os níveis de mRNA do VEGF.

O conjunto destes registros da literatura e dos nossos resultados sugerem que os subtipos não agressivos (superficial e nodular) podem se distinguir daqueles agressivos (esclerodermiforme e micronodular) por meio da expressão do VEGF observada por vários métodos. Tais análises sugerem que a expressão do VEGF e a angiogênese podem ter um papel relevante na progressão para agressão e infiltração do CBC.

6 CONCLUSÕES

Considerando-se a elevada prevalência e morbidade do CBC, fatores preditivos para o desfecho em margens cirúrgicas comprometidas são de fundamental relevância para o planejamento do tratamento cirúrgico e obtenção das mais elevadas taxas de cura.

Os resultados obtidos neste estudo permitem as seguintes conclusões:

- i) Homens e indivíduos idosos representam os grupos de risco para o desenvolvimento do CBC, mas não para o comprometimento das margens cirúrgicas;
- *ii)* O segmento cefálico, em particular a região nasal, e o subtipo micronodular, seguido do esclerodermiforme, implicam em riscos elevados para o comprometimento das margens e merecem atenção quanto ao seu manuseio cirúrgico por especialistas treinados;
- iii) A marcação homogênea e de intensidade moderada a acentuada das células neoplásicas em todos os subtipos do CBC pelo Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina é indicativa do potencial auxílio destes marcadores, para a identificação de ninhos tumorais multifocais no subtipo superficial, ou em meio ao processo inflamatório nos subtipos agressivos;
- *iv)* O marcador MNF116 pode ser útil na discriminação entre CBC agressivos (esclerodermiforme e micronodular) e os não agressivos (nodular e superficial);
- v) A expressiva marcação da E-Caderina no CBC superficial pode representar o seu padrão menos agressivo e radial de crescimento;
- vi) O elevado percentual de células marcadas pelo VEGF no infiltrado peritumoral dos tumores agressivos é indicativo do papel desta proteína no comportamento mais invasivo destes subtipos do CBC;
- vii) A especialidade Dermatologia tem expressiva participação institucional com a mais elevada resolubilidade, representada pela maior frequência de excisão de CBC e a menor de margens cirúrgicas comprometidas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abbas O, Richards JE, Yaar R, Mahalingam M. Stem cell markers (cytokeratin 15, cytokeratin 19 and p63) in in situ and invasive cutaneous epithelial lesions. Mod Pathol. 2011;24:90-7.

Abbas O, Bhawan J. Expression of stem cell markers nestin and cytokeratin 15 and 19 in cutaneous malignancies. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011;25:311-6.

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

Alam M, Desai S, Nodzenski M, Dubina M, Kim N, Martini M, Fife D, Reid D, Pirigyi M, Poon E, Hsu J, Yoo S, Bhatia A. Active ascertainment of recurrence rate after treatment of primary basal cell carcinoma (BCC). J Am Acad Dermatol. 2015;73:323-5.

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

American Cancer Society. Skin cancer: basal and squamous cell. Atlanta, Ga, 2015. Disponível em www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent /003075-pdf.pdf. Acessado em 30/08/2015.

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

Anderson-Dockter H, Clark T, Iwamoto S, Lu M, Fiore D, Falanga JK, Falanga V. Diagnostic utility of cytokeratin 17 immunostaining in morpheaform basal cell carcinoma and for facilitating the detection of tumor cells at the surgical margins. Dermatol Surg. 2012 Aug;38(8):1357-66.

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.

Armstrong BK, Kricker A. The epidemiology of UV induced skin cancer. J Photochem Photobiol B. 2001;63:8-18.

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

Arnspang S, Pottegård A, Friis S, Clemmensen O, Andersen KE, Hallas J, et al. Statin use and risk of nonmelanoma skin cancer: a nationwide study in Denmark. Br J Cancer. 2015;112:153-6.

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. [Epub ahead of print]

Aszterbaum M, Beech J, Epstein EH Jr. Ultraviolet radiation mutagenesis of hedgehog pathway genes in basal cell carcinomas. J Investig Dermatol Symp Proc. 1999;4:41-5.

Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, Douglas V, LeBoit PE, Scott MP, Epstein EH Jr. Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. Nat Med. 1999;5:1285-91.

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.

Bartoš V, Pokorný D, Zacharová O, Haluska P, Doboszová J, Kullová M, et al. Recurrent basal cell carcinoma: a clinicopathological study and evaluation of histomorphological findings in primary and recurrent lesions. Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat. 2011;20:67-75.

Barnetson RS, Satchell A, Zhuang L, Slade HB, Halliday GM. Imiquimod induced regression of clinically diagnosed superficial basal cell carcinoma is associated with

early infiltration by CD4 T cells and dendritic cells. Clin Exp Dermatol. 2004;29:639-43.

Bassas P, Hilari H, Bodet D, Serra M, Kennedy FE, García-Patos V. Evaluation of surgical margins in Basal cell carcinoma by surgical specialty. Actas Dermosifiliogr. 2013;104:133-40.

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;110:880-4.

Bath-Hextall F, Leonardi-Bee J, Smith C, Meal A, Hubbard R. Trends in incidence of skin basal cell carcinoma. Additional evidence from a UK primary care database study. Int J Cancer. 2007;121:2105-8.

Bath-Hextall F, Leonardi-Bee J, Somchand N, Webster A, Delitt J, Perkins W. Interventions for preventing non-melanoma skin cancers in high-risk groups. Cochrane Database Syst Rev. 2007;(4):CD005414.

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

Battistella M, Carlson JA, Osio A, Langbein L, Cribier B. Skin tumors with matrical differentiation: lessons from hair keratins, beta-catenin and PHLDA-1 expression. J Cutan Pathol. 2014;41:427-36.

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

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.

Bisson MA, Dunkin CS, Suvarna SK, Griffiths RW. Do plastic surgeons resect basal cell carcinomas too widely? A prospective study comparing surgical and histological margins. Br J Plast Surg. 2002;55:293-7.

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;64:144-51.

Bozan A, Gode S, Kaya I, Yaman B, Uslu M, Akyildiz S, et al. Long-term Follow-up of Positive Surgical Margins in Basal Cell Carcinoma of the Face. Dermatol Surg. 2015;41:761-7.

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

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

Breitbart EW, Greinert R, Volkmer B. Effectiveness of information campaigns. Prog Biophys Mol Biol. 2006;92:167-72.

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;18:167-74.

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

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

Castori M, Morrone A, Kanitakis J, Grammatico P. Genetic skin diseases predisposing to basal cell carcinoma. Eur J Dermatol. 2012; 22:299-309.

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.

Chen CC, Chen CL. Clinical and histopathologic findings of superficial basal cell carcinoma: A comparison with other basal cell carcinoma subtypes. J Chin Med Assoc. 2006;69:364-71.

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.

Cigna E, Tarallo M, Maruccia M, Sorvillo V, Pollastrini A, Scuderi N. Basal cell carcinoma: 10 years of experience. J Skin Cancer. 2011;2011:476362.

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

Clarke LE, Conway AB, Warner NM, Barnwell PN, Sceppa J, Helm KF. Expression of CK7, Cam 5.2 and Ber-Ep4 in cutaneous squamous cell carcinoma. J Cutan Pathol. 2013; 40:646-50.

Codazzi D, Van Der Velden J, Carminati M, Bruschi S, Bocchiotti MA, Di Serio C, et al. Positive compared with negative margins in a single-centre retrospective study on 3957 consecutive excisions of basal cell carcinomas. Associated risk factors and preferred surgical management. J Plast Surg Hand Surg. 2014;48:38-43.

Conscience I, Jovenin N, Coissard C, Lorenzato M, Durlach A, Grange F, et al. P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas. Eur J Dermatol. 2006; 16:518-22.

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

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

Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, Tollefson MM, Otley CC, Weaver AL, Roenigk RK. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. JAMA. 2005;294:681-90.

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

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

Dasgeb B, Mohammadi TM, Mehregan DR. Use of Ber-EP4 and Epithelial Specific Antigen to Differentiate Clinical Simulators of Basal Cell Carcinoma. Biomark Cancer. 2013;5:7-11.

Decraene D, Agostinis P, Pupe A, de Haes P, Garmyn M. Acute response of human skin to solar radiation: regulation and function of the p53 protein. J Photochem Photobiol B. 2001;63:78-83.

de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. J Photochem Photobiol B. 2001;63:19-27.

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 Gruijl FR. p53 mutations as a marker of skin cancer risk: comparison of UVA and UVB effects. Exp Dermatol. 2002;11:37-9.

de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. Methods Enzymol. 2000;319:359-66.

Demers AA, Nugent Z, Mihalcioiu C, Wiseman MC, Kliewer EV. Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. J Am Acad Dermatol. 2005;53:320-8.

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.

de Zwaan SE, Haass NK. Genetics of basal cell carcinoma. Australas J Dermatol. 2010;51:81-92.

Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. Br J Dermatol. 2002;146:1-6.

Dieu T, Macleod AM. Incomplete excision of basal cell carcinomas: a retrospective audit. ANZ J Surg. 2002;72:219-21.

Di Stefani A, Chimenti S. Basal cell carcinoma: clinical and pathological features. G Ital Dermatol Venereol. 2015;150:385-91.

Dreier J, Cheng PF, Bogdan Alleman I, Gugger A, Hafner J, Tschopp A, et al. Basal cell carcinomas in a tertiary referral centre: a systematic analysis. Br J Dermatol. 2014;171:1066-72.

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

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

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

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

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;51:80-6.

Farhi D, Dupin N, Palangié A, Carlotti A, Avril MF. Incomplete excision of basal cell carcinoma: rate and associated factors among 362 consecutive cases. Dermatol Surg. 2007;33:1207-14.

Felício LBA, Ferreira J, Bentley MVB, Bagnato VS, Tedesco AC, Souza CS. A terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico como modalidade de tratamento para neoplasias cutâneas não-melanoma. An. Bras. Dermatol. 2008;83:309-16.

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

Fleischer AB Jr, et al. The specialty of the treating physician affects the likelihood of tumor-free resection margins for basal cell carcinoma: results from a multi-institutional retrospective study. J Am Acad Dermatol. 2001; 44:224-30.

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

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

Fulga V, Rudico L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Margan MM, et al. Differential expression of e-cadherin in primary breast cancer and corresponding lymph node metastases. Anticancer Res. 2015;35:759-65.

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

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

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

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

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.

Garssen J, van Loveren H. Effects of ultraviolet exposure on the immune system. Crit Rev Immunol. 2001;21:359-97.

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

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

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

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

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

Granstein RD, Matsui MS. UV radiation-induced immunosuppression and skin cancer. Cutis. 2004 Nov;74:4-9.

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

Griffiths RW. Audit of histologically incompletely excised basal cell carcinomas: recommendations for management by re-excision. Br J Plast Surg. 1999; 52:24-8.

Griffiths RW, Suvarna SK, Stone J. Basal cell carcinoma histological clearance margins: an analysis of 1539 conventionally excised tumours. Wider still and deeper? J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2007;60:41-7.

Griffiths RW, Suvarna SK, Stone J. Do basal cell carcinomas recur after complete conventional surgical excision? Br J Plast Surg. 2005; 58:795-805.

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, et al. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. Nat Genet. 2008;40:886-91.

Gudi V, Ormerod AD, Dawn G, Green C, MacKie RM, Douglas WS, Gupta G; Scottish Dermatological Society. Management of basal cell carcinoma by surveyed dermatologists in Scotland. Clin Exp Dermatol. 2006;31:648-52.

Gulleth Y, Goldberg N, Silverman RP, Gastman BR. What is the best surgical margin for a Basal cell carcinoma: a meta-analysis of the literature. Plast Reconstr Surg. 2010;126:1222-31.

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

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

Hajeer AH, Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. Microsc Res Tech. 2000;50:216-28.

Hajeer AH, Lear JT, Ollier WE, Naves M, Worthington J, Bell DA, et al. Preliminary evidence of an association of tumour necrosis factor microsatellites with increased risk of multiple basal cell carcinomas. Br J Dermatol. 2000;142:441-5.

Han J, Colditz GA, Hunter DJ. Risk factors for skin cancers: a nested case-control study within the Nurses' Health Study. Int J Epidemiol. 2006;35:1514-21.

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;45:694-700.

Han J, Kraft P, Colditz GA, Wong J, Hunter DJ. Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk. Int J Cancer. 2006;119:1976-84.

Heitzer E, Wolf P. Nonmonoclonal PTCH gene mutations in psoralen plus UVA-associated basal cell carcinomas. J Invest Dermatol. 2008;128:746-9.

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:Unit 21.4.

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

Hussein MR. Skin cancer in Egypt: a word in your ear. Cancer Biol Ther. 2005;4:593-5.

Husein-Elahmed H, Aneiros-Fernandez J, Gutierrez-Salmeron MT, Aneiros-Cachaza J, Naranjo-Sintes R. Basal cell carcinoma: analysis of factors associated with incomplete excision at a referral hospital in southern Spain. Cutis. 2014;93:155-61.

Instituto Nacional de Câncer - INCA [internet]. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. [Acesso: 20 Jul. 2014]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/.

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

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 inbasal cell carcinoma. J Cutan Pathol. 2008;35:916-21.

Janjua OS, Qureshi SM. Basal cell carcinoma of the head and neck region: an analysis of 171 cases. J Skin Cancer. 2012;2012:943472.

Jimenez F J, Burchette J L Jr, Grichnik J M, Hitchcock M G. Ber-EP4 immunoreactivity in normal skin and cutaneous neoplasms. Mod Pathol 1995:8:854–858.

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.

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

Karagas MR, Zens MS, Li Z, Stukel TA, Perry AE, Gilbert-Diamond D, et al. Early-onset basal cell carcinoma and indoor tanning: a population-based study. Pediatrics. 2014;134:e4-12.

Khalesi M, Whiteman DC, Rosendahl C, Johns R, Hackett T, Cameron A, et al. NHMRC Centre of Research Excellence in Sun and Health. Basal cell carcinomas on sun-protected vs. sun-exposed body sites: a comparison of phenotypic and environmental risk factors. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2015;31:202-11.

Kirzhner M, Jakobiec FA, Borodic G. Desmoplastic trichoepithelioma: report of a unique periocular case. Ophthal Plast Reconstr Surg. 2012;28:e121-3.

Koh D, Wang H, Lee J, Chia KS, Lee HP, Goh CL. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968-97. Br J Dermatol. 2003;148:1161-6.

Koyuncuer A. Histopathological evaluation of non-melanoma skin cancer. World J Surg Oncol. 2014;12:159.

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; 20:217-28.

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

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.

Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Tzellos TG, Xirou P, Kitikidou K, Antoniades K, et al. Clinical, histological and demographic predictors for recurrence and second primary tumours of head and neck basal cell carcinoma. A 1062 patient-cohort study from a tertiary cancer referral hospital. Eur J Dermatol. 2010;20:276-82.

Lallas A, Apalla Z, Argenziano G, Longo C, Moscarella E, Specchio F, et al. The dermatoscopic universe of basal cell carcinoma. Dermatol Pract Concept. 2014;4:11-24.

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 KC, Higgins HW 2nd, Linden O, Cruz AP. Gender differences in tumor and patient characteristics in those undergoing Mohs surgery. Dermatol Surg. 2014;40:686-90.

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.

Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. Adv Exp Med Biol. 2014;810:120-40.

Levine N, Moon TE, Cartmel B, Bangert JL, Rodney S, Dong Q, et al. Trial of retinol and isotretinoin in skin cancer prevention: a randomized, double-blind, controlled trial.

Southwest Skin Cancer Prevention Study Group. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6:957-61.

Linskey KR, Gimbel DC, Zukerberg LR, Duncan LM, Sadow PM, Nazarian RM. BerEp4, cytokeratin 14, and cytokeratin 17 immunohistochemical staining aid in differentiation of basaloid squamous cell carcinoma from basal cell carcinoma with squamous metaplasia. Arch Pathol Lab Med. 2013;137:1591-8.

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

Magee Al, Buxton RS. Transmembrane molecular assemblies regulated by the greater cadherin family. Curr. Opin. Cell Biol. 1991;3:854-61.

MacKie RM. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. Prog Biophys Mol Biol. 2006;92:92-6.

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

Mantese SA, Diogo PM, Rocha A, Berbert AL, Ferreira AK, Ferreira TC. Cutaneous horn: a retrospective histopathological study of 222 cases. An Bras Dermatol. 2010;85:157-63.

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

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

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

Marzuka AG, Book SE. Basal cell carcinoma: pathogenesis, epidemiology, clinical features, diagnosis, histopathology, and management. Yale J Biol Med. 2015;88:167-79.

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.

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

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

Mina MA, Picariello A, Fewkes JL. Superficial basal cell carcinomas of the head and neck. Dermatol Surg. 2013; 39:1003-8.

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;9:140-3.

Moldenhauer G, Momburg F, Moller P, et al. Epithelium specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. Br J Cancer 1987;56:714–721.

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.

Narayanan K, Hadid OH, Barnes EA. Mohs micrographic surgery versus surgical excision for periocular basal cell carcinoma. Cochrane Database Syst Rev. 2014 Dec 12:12:CD007041.

Neale RE, Davis M, Pandeya N, Whiteman DC, Green AC. Basal cell carcinoma on the trunk is associated with excessive sun exposure. J Am Acad Dermatol. 2007;56:380-6.

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

Niwa Y, Niimi C, Goto H, Ohmiya N, Hayakawa T, Nagasaka T, Nakashima N. Usefulness of p53 and Ki-67 immunohistochemical analysis for preoperative diagnosis of extremely well-differentiated gastric adenocarcinoma. Am J Clin Pathol. 2002;118:683-92.

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.

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

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

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

Orchard GE, Wojcik K, Shams F, Georgaki E, Quaye CJ, Fernando P, et al. Pancytokeratin 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;72:61-6.

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

Otley CC, Cherikh WS, Salasche SJ, McBride MA, Christenson LJ, Kauffman HM. Skin cancer in organ transplant recipients: effect of pretransplant end-organ disease. J Am Acad Dermatol. 2005;53:783-90.

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

Pandeya N, Purdie DM, Green A, Williams G. Repeated occurrence of basal cell carcinoma of the skin and multifailure survival analysis: follow-up data from the Nambour Skin Cancer Prevention Trial. Am J Epidemiol. 2005;161:748-54.

Perera E, Gnaneswaran N, Staines C, Win AK, Sinclair R. Incidence and prevalence of non-melanoma skin cancer in Australia: A systematic review. Australas J Dermatol. 2015 Feb 25. [Epub ahead of print]

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

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; 69:157-62.

Pranteda G, Grimaldi M, Lombardi M, Pranteda G, Arcese A, Cortesi G, et al. Basal cell carcinoma: differences according to anatomic location and clinical-pathological subtypes. G Ital Dermatol Venereol. 2014;149:423-6.

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

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

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;23:234-41.

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

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

Ramachandran S, Hoban PR, Ichii-Jones F, Pleasants L, Ali-Osman F, Lear JT, et al. Glutathione S-transferase GSTP1 and cyclin D1 genotypes: association with numbers

of basal cell carcinomas in a patient subgroup at high-risk of multiple tumours. Pharmacogenetics. 2000;10:545-56.

Ramos J, Villa J, Ruiz A, Armstrong R, Matta J. UV dose determines key characteristics of nonmelanoma skin cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2004;13:2006-11.

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;169:245-50.

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

Reinau D, Surber C, Jick SS, Meier CR. Epidemiology of basal cell carcinoma in the United Kingdom: incidence, lifestyle factors, and comorbidities. Br J Cancer. 2014;111:203-6.

Richmond-Sinclair NM, et al. Incidence of basal cell carcinoma multiplicity and detailed anatomic distribution: longitudinal study of an Australian population. J Invest Dermatol. 2009;129:323-8

Riml S, Larcher L, Kompatscher P. Complete excision of nonmelanotic skin cancer: a matter of surgical experience. Ann Plast Surg. 2013;70:66-9.

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

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

Rodriguez-Villanueva J, Colome MI, Brisbay S, McDonnell TJ. The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. Pathol Res Pract. 1995;191:391-8.

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

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

Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. N Engl J Med. 2005;353:2262-9.

Rudolph C, Schnoor M, Eisemann N, Katalinic A. Incidence trends of nonmelanoma skin cancer in Germany from 1998 to 2010. J Dtsch Dermatol Ges. 2015;13:788-97.

Rumelt S. Histologic safety margins of periocular BCC. Ophthalmology. 2010;117:403-4.

Rünger TM. Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 1999;15:212-6.

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

Salmon P, Mortimer N, Rademaker M, Adams L, Stanway A, Hill S. Surgical excision of skin cancer: the importance of training. Br J Dermatol. 2010;162:117-22.

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

Schäfer I, Reusch M, Siebert J, Spehr C, Augustin M. Health care characteristics of basal cell carcinoma in Germany: the role of insurance status and socio-demographic factors. J Dtsch Dermatol Ges. 2014;12:803-11.

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

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

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;40:363-70.

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

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

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

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

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;32:167-70.

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

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

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.

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

Souza CS. Câncer da Pele: Estratégias de Prevenção e Terapêuticas Inovadoras [Livre Docência]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2015.

Souza CS, Felicio LB, Ferreira J, Kurachi C, Bentley MV, Tedesco AC, Bagnato VS. Long-term follow-up of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy diode laser single session for non-melanoma skin câncer. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2009;6:207-13.

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

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

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.

Stoica LE, Georgescu CV, Pătraşcu V, Radu CC, Tolea I, Mogoantă L. Basal cell carcinomas - clinical-evolutional and histopahotologic aspects. Curr Health Sci J. 2009;35:228-33.

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.

Swanson PE, Fitzpatrick MM, Ritter JH, Glusac EJ, Wick MR. Immunohistologic differential diagnosis of basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and trichoepithelioma in small cutaneous biopsy specimens. J Cutan Pathol. 1998;25:153-9.

Szewczyk MP, Pazdrowski J, Dańczak-Pazdrowska A, Golusiński P, Majchrzak E, Luczewski L, Marszałek S, Silny W, Golusiński W. Analysis of selected recurrence risk factors after treatment of head and neck basal cell carcinoma. Postepy Dermatol Alergol. 2014;31:146-51.

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

Takeichi, M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science 1991;251:1451-5.

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 J P, Domingues J C, Baptista A P. Monoclonal antibody Ber EP4 distinguishes basal-cell carcinoma from squamous-cell carcinoma of the skin. Am J Dermatopathol 1993:15:452–5.

Thomas DJ, King AR, Peat BG. Excision margins for nonmelanotic skin cancer. Plast Reconstr Surg. 2003;112:57-63.

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

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

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

van Iersel CA, van de Velden HV, Kusters CD, Spauwen PH, Blokx WA, Kiemeney LA, et al. Prognostic factors for a subsequent basal cell carcinoma: implications for follow-up. Br J Dermatol. 2005;153:1078-80.

Vanjaka-Rogošić L, Puizina-Ivić N, Mirić L, Rogošić V, Kuzmić-Prusac I, Babić MS, et al. Matrix metalloproteinases and E-cadherin immunoreactivity in different basal cell carcinoma histological types. Acta Histochem. 2014;116:688-93.

van Loo E, Mosterd K, Krekels GA, Roozeboom MH, Ostertag JU, Dirksen CD, et al. Surgical excision versus Mohs' micrographic surgery for basal cell carcinoma of the face: A randomised clinical trial with 10 year follow-up. Eur J Cancer. 2014;50:3011-20.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature. 2000;408:307-10.

Vuletic MS, Jancic SA, Ilic MB, Azanjac GLj, Joksimovic IS, Milenkovic SM, Janicijevic-Petrovic MA, Stankovic VD. Expression of vascular endothelial growth factor and microvascular density assessment in different histotypes of basal cell carcinoma. J BUON. 2014;19:780-6.

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;151:382-8.

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

White JO, Jones RN, Croxtall JD, Gleeson RP, Krausz T, Pervez S, Jamil A, Guida L, Beesley JE, Soutter WP. The human squamous cervical carcinoma cell line, HOG-1, is responsive to steroid hormones. Int J Cancer. 1992;52:247-51.

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

Woodhead AD, Setlow RB, Tanaka M. Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer. J Epidemiol. 1999;9:S102-14.

Wu S, Han J, Li WQ, Li T, Qureshi AA. Basal-cell carcinoma incidence and associated risk factors in U.S. women and men. Am J Epidemiol. 2013;178:890-7.

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

Xiang F, Lucas R, Hales S, Neale R. Incidence of nonmelanoma skin cancer in relation to ambient UV radiation in white populations, 1978-2012: empirical relationships. JAMA Dermatol. 2014;150:1063-71.

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;30:33-41.

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

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;12:299-305.

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

Yu SH, Bordeaux JS, Baron ED. The immune system and skin cancer. Adv Exp Med Biol. 2014;810:182-91.

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.

ANEXOS



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



Ribeirão Preto, 16 de janeiro de 2013

Oficio nº 139/2013 CEP/RCC

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"BIOMARCADORES NO CARCINOMA BASOCELULAR"**, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 16821/2012.

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.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução $n^{\rm o}$ 196/96 CNS/MS.

mds

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

Atenciosamente

PROF DR. RICARDO DE CARVALHO CAVALLI Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
ROBERTO BUENO FILHO
PROF^a.DR^a. CACILDA DA SILVA SOUZA(Orientadora)
Depto. de Clínica Médica

ARTIGO

ARTIGO

MARCADORES PREDITIVOS DO COMPROMETIMENTO DAS MARGENS CIRÚRGICAS DO CARCINOMA BASOCELULAR

Roberto Bueno Filho¹, Bruno de Carvalho Fantini¹, Cacilda da Silva Souza²

- Pós-graduando, Preceptor e Médico Assistente do Departamento de Clínica
 Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
 Divisão de Dermatologia
- ² Docente do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo Divisão de Dermatologia

INTRODUÇÃO

O carcinoma basocelular (CBC) é a neoplasia mais frequente no ser humano, correspondendo, somente entre os tumores cutâneos malignos a 70% de todos os casos. Apesar de sua alta incidência, caracteristicamente apresenta baixos índices de mortalidade e metastatização (máximo de 0,55%). No entanto, o acometimento deste tumor em áreas nobres faciais geram grande morbidade aos pacientes, podendo resultar em defeitos estético-funcionais irreparáveis.

A epidemiologia e etiopatogenia desta neoplasia mostram que tanto fatores genéticos como ambientais são decisivos na formação dos tumores basocelulares. Desde os genes que determinam fenótipo ruivo, presença de sardas e coloração dos olhos, até os genes classicamente associados a mutações acumulativas que culminam em neoplasias, como o p 53, a gama da fatores de risco intrínsecos ao indivíduo se somam aos fatores ambientais, como exposição à radiação ultravioleta.

Clinicamente, sabe-se que a predisposição ao aparecimento do CBC é maior em indivíduos acima de 60 anos, do sexo masculino, em localização facial e com história de exposição solar laboral. No entanto, algumas mudanças clínico-epidemiológicas tem sido notada no últimos anos, como por exemplo o aumento deste tumor no sexo feminino e em pacientes mais jovens.

Do ponto de visto histológico e imuno-histoquímico, os tumores diagnosticados como esclerodermiforme, micronodular, infiltrativo e metatípico são classificados na literatura como mais agressivos e com potencial de maior recidivas e morbidade para o paciente. Marcadores imuno-histoquímicos como Ber-EP4 mostram grande especificidade para identificação e classificação do CBC; o MNF 116, que marca citoqueratinas humanas, mostra importância na diferenciação dos carcinomas com sarcomas; E-Caderina é uma proteína de adesão celular cuja perda de expressão torna o tumor mais agressivo e invasivo; VEGF é marcador de proliferação vascular, cuja maior expressão mostra maior crescimento tumoral.

Dessa forma, objetivamos estabelecer os fatores clínico-patológicos que possam influenciar na presença de margens cirúrgicas comprometidas no tratamento do CBC.

PACIENTES E MÉTODOS

O estudo transversal, descritivo e retrospectivo, analisou 674 casos de CBC removidos por diferentes especialidades, em unidade hospitalar terciária (HCFMRP-USP), no ano de 2011. Foram coletados dados demográficos (sexo e idade), clínicos (localização) e histopatológicos (subtipo histológico, dimensão, comprometimento das margens cirúrgicas) dos casos de CBC e a especialidade responsável pela sua remoção.

Foram incluídas no estudo 65 casos de CBC, sendo 19 nodulares, 16 superficiais, 18 esclerodermiformes e 12 micronodulares, para análise da expressão de Ber-EP4, MNF 116, E-Caderina e VEGF através de imuno-histoquímica (IHQ).

Cortes parafinados de 4µm de espessura de fragmentos do tumor foram submetidos a etapas consecutivas de desparafinização e à reação de IHQ, por meio do HRP-polímero (*EasyLink HRP-Polymer kit with DAB*; Immunobioscience Corp., USA). Os anticorpos utilizados foram os monoclonais Ber EP4 (clone Ber Ep4, Dako – diluição 1:200), MNF 116 (clone NF116, Dako – diluição 1:100), VEGF (clone G153-694, BD – diluição 1:2000) e E-Caderina (clone 36/E-Cadherin, BD – diluição 1:1000).

A análise quantitativa da imunomarcação para a expressão dos anticorpos nos cortes histológicos de biópsias cutâneas foi realizada através de sistema de análise de imagem que inclui um microscópio (Zeiss Imager M1c) acoplado a uma câmera colorida (Axiocam MRc5) e a um computador, contendo o software (Axiovision 4.0 Carl Zeiss Vision), do Laboratório de Neurologia Clínica da FMRP-USP. Para os anticorpos anti-Ber EP 4, MNF 116 e E-Caderina, realizou-se o cálculo de intensidade de marcação dos tumores e a porcentagem de área tumoral marcada pelos anticorpos com uso do *software* Image J (versão 1.49, National Institute of Health, USA).

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, também realizado no *software* Image J versão 1.49.

A análise estatística foi realizada seguindo os seguintes critérios: para cruzamento de dados entre as variáveis categóricas (sexo, clínica, local, ulceração, histologia e idade categorizada), realizou-se o teste Qui-quadrado (X²). Para cruzamento entre variáveis numéricas e categóricas, realizou-se a análise de variâncias (ANOVA). Para análise univariada das margens comprometidas como variável dependente, utilizou-se o teste t para idade e tamanho (numéricas), curva ROC para categorização de idade e teste X² para sexo, clínica, local, ulceração e histologia (variáveis categóricas). Para análise multivariada das margens comprometidas, utilizou-se a regressão logística binária multivariada. Para análise da marcação IHQ, por se tratar de variáveis numéricas, foram utilizados os testes ANOVA, Kruskal-Wallis e Teste t.

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). Nível de significância adotado com $p \le 0.05$.

RESULTADOS

Na amostra de 674 casos de CBC removidos por cirurgia no HCFMRP-USP, 407 eram indivíduos masculinos (60,4%) e 267 femininos (39,6%) [Gráfico 1b]. A idade média foi de 68 anos, sendo a mínima de 22 e a máxima de 95 anos, com picos entre a quinta e oitava décadas da vida [Gráfico 1a]. A idade média no sexo masculino e no feminino foi exatamente a mesma, 68 anos. Segundo a distribuição topográfica, houve predomínio do segmento cefálico (71%), seguido do tronco (17%) e membros (12%) [Gráfico 1c]. Dentre os subtipos histológicos, prevaleceu o nodular (61%), seguido do superficial (14%), micronodular (12%), esclerodermiforme (10%) e outros [infiltrativo e basoescamoso] (3%) [Gráfico 1d]. A prevalência da ulceração dos tumores, por avaliação histopatológica, foi de 41%.

Dentre os 674 casos tratados cirurgicamente, a especialidade Dermatologia foi responsável pela maioria das cirurgias com 78% dos casos (n= 526), seguida da Cirurgia de Cabeça e Pescoço [CCP] (11%; n= 74), Oftalmologia (5%; n= 34), Cirurgia Plástica (4%; n= 27) e outras especialidades não especificadas (2%; n= 13) [Gráfico 1e]. A dimensão média dos tumores excisados foi de 274 mm² na Dermatologia, 279 mm² na Cirurgia Plástica, 218 mm² na CCP, 87 mm² na Oftalmologia, e 388 mm² nas outras clínicas. O índice de margens livres de cada especialidade foi de 95% para a Dermatologia, 89% para a Cirurgia Plástica, 60% para CCP, 49% para Oftalmologia e 80% para outras clínicas [Gráfico 2].

Pela análise univariada, a localização revelou ser fator determinante para o comprometimento das margens cirúrgicas, sendo o segmento cefálico de maior risco comparado ao tronco (OR 20; IC 95% 2,94 – 100; p< 0,001) e aos membros (OR 14,29; IC 95% 2,0 – 100; p< 0,001). Como mostrado na tabela 1, há redução do risco de margens cirúrgicas comprometidas de tumores excisados no tronco e nos membros comparados aos do segmento cefálico (OR 0,05; IC 95% 0,01 – 0,34; p< 0,001 e OR 0,07; IC 95% 0,01 – 0,50; p< 0,001, respectivamente).

O subtipo histológico do CBC também influencia no desfecho do comprometimento das margens cirúrgicas. Os subtipos esclerodermiforme e micronodular apresentam maior risco para o comprometimento das margens comparados ao nodular (OR 2,52; IC 95% 1,30 – 4,86 e OR 2,93; IC 95% 1,61 – 5,34, respectivamente, p= 0,02) e ao superficial (OR 26,18; IC 95% 3,37 – 203,73 e OR 30,48; IC 95% 3,99 – 232,94, respectivamente, p< 0,001). O subtipo superficial mostrou-se com menor risco para o comprometimento das margens comparado ao nodular (OR 0,10; IC 95% 0,01 – 0,71; p= 0,005). Ainda, a presença de ulceração mostrou maior risco para o desfecho das margens comprometidas (OR 2,43; IC 95% 1,50 – 3,94; p< 0,001).

Outro fator positivamente associado ao comprometimento de margens cirúrgicas positivas na análise univariada foi a especialidade responsável pela excisão do CBC. As especialidades Oftalmologia e CCP apresentaram percentuais de margens comprometidas significativamente maiores que a Dermatologia (OR: 16,31; IC 95% 7,36 – 36,12; p= 0,008 e OR: 13,02; IC 95% 7,14 – 23,75; p= 0,008, respectivamente); e a Cirurgia Plástica, menor percentual do comprometimento de margens comparada à Oftalmologia (OR 7,06; IC 95% 1,76 – 28,25; p= 0,03) e à CCP (OR 5,64; IC 95% 1,56 – 20,38; p= 0,03).

Na análise univariada, os fatores dimensão do tumor, sexo e idade categorizada (73 anos) não mostraram relação com o comprometimento das margens cirúrgicas (p= 0,32 – Teste t; p= 0,83 e p= 0,19 – Teste X², respectivamente).

Na análise de regressão logística binária multivariada para identificação de fatores de risco para margens comprometidas (variável dependente) revelou que o subtipo histológico micronodular apresentou o maior risco do comprometimento (OR 3,41; IC 95% 1,71 - 6,80; p= 0,001), e o subtipo esclerodermiforme, uma forte tendência do comprometimento das margens, mas sem significância estatística (OR 1,90; IC 95% 0,89 - 4,05; p= 0,093).

A localização em segmento cefálico é fator de risco para o comprometimento de margens cirúrgicas, comparado ao tronco (OR 8,33 IC 95% 1,05 – 50; p= 0,045) e aos membros (OR 7,69 IC 95% 1,0 – 50; p= 0,05). Na tabela 1, pode ser observado a redução do risco dos tumores excisados no tronco e nos membros comparados aos do segmento cefálico (OR 0,12; IC 95% 0,02 – 0,95; p= 0,045 e OR 0,13; IC 95% 0,02 – 1,00; p= 0,051, respectivamente). Ainda, os tumores excisados pelas especialidades Oftalmologia e CCP apresentaram maior risco para o desfecho de margens comprometidas (OR 10,12; IC 95% 4,40 – 23,27; p= 0,001 [Oftalmologia] e OR 9,67; IC 95% 5,14 – 18,21; p= 0,001 [CCP]). Os resultados obtidos nas análises univariada e multivariada foram sumariados na tabela 1.

O resultado da imunomarcação com os anticorpos Ber-EP4, MNF116 e E-Caderina, foram analisados por intensidade de marcação e porcentagem de área marcada (realizado pelo *software* Image J), sendo, então realizado o escore, que resulta da multiplicação dos dois primeiros fatores (intensidade x % área), formato no qual dispomos os resultados. Já a marcação com VEGF foi mensurada por contagem de células inflamatórias peritumorais (PT) que expressaram imuno-marcação [Figura 1].

Os escores do anticorpo Ber-EP4 foram considerados acentuados e com padrão homogêneo em todos os tipos histológicos de CBC. Seus valores médios variaram entre 58,49 a 78,54 nos quatro subtipos histológicos, sendo o do CBC nodular inferior comparado ao esclerodermiforme (58,49 x 78,54; p= 0,04, ANOVA) [Gráfico 3a]. Os escores médios obtidos com marcação MNF116, que também se mostrou forte e homogênea entre os tipos de CBC, variou de 69,3 a 91, e indicou valor inferior no CBC nodular comparado ao do esclerodermiforme (69,2 x 87,3; p= 0,01, ANOVA) e ao do micronodular (69,2 x 91; p= 0,005, ANOVA) [Gráfico 3b]. Na comparação entre os escores médios obtidos com a marcação com a E-Caderina, notou-se menor intensidade de marcação nos quatro tipos histológicos, com valores variando entre 11,97 a 25,77, e inferiores aos demais anticorpos. O valor do escore do CBC superficial foi superior ao do CBC nodular (25,77 x 11,97; p= 0,03, ANOVA) [Gráfico 3c].

A marcação de células inflamatórias PT pelo anticorpo VEGF mostrou-se com intensidade leve nos subtipos superficiais, e intensidade leve a moderada nos subtipos nodulares. Já nos subtipos micronodular e esclerodermiforme a intensidade da marcação das células do infiltrado PT foi considerada intensa. A análise estatística mostrou maior marcação do VEGF no esclerodermiforme em comparação ao nodular (33,86% x 16,48%; p= 0,003; ANOVA) e ao superficial (33,86% x 10,94%; p< 0,001; ANOVA). Ainda, o subtipo o micronodular mostrou com maior marcação do VEGF comparado ao superficial (26,55% x 10,94%; p= 0,04; ANOVA) [Gráfico 3d].

DISCUSSÃO

A elevada incidência do CBC na população implica em significativo impacto no sistema de saúde, considerando-se a intervenção cirúrgica dos tumores primários e recorrentes. Nossos resultados da análise clínica corroboram a prevalência de CBC no sexo masculino, na faixa etária entre a quinta e oitava décadas de vida, da localização no

segmento cefálico e do tipo histológico nodular. Em concordância, nossos achados indicam que tumores localizados no segmento cefálico e os tipos histológicos agressivos consistem em fatores de risco para comprometimento de margens cirúrgicas.

Em comparação ao tronco, o segmento cefálico apresenta OR 8,33 e aos membros OR 7,69. Já os CBCs esclerodermiformes tem OR 1,9 e os micronodulares OR 3,41 na análise multivariada, mostrando o aumento do risco em desfecho de margens comprometidas.

A completa ressecção é um dos mais relevantes critérios de qualidade no tratamento cirúrgico, reduzindo a recidiva. O presente estudo ressalta a atuação da Dermatologia na resolução cirúrgica dos casos de CBC (78%), os elevados índices de margens livres (95%) a despeito da dimensão média dos tumores (274 mm²) comparados às demais especialidades.

Baixos índices de margens livres na Oftalmologia, assim como na CCP, podem ser justificados pela tentativa da preservação de tecidos saudáveis e nobres, região facial, perinasal, periocular, mas fortalece a indicação de técnicas mais precisas no controle das margens, como a cirurgia micrográfica. Estudos prévios já têm indicado que taxas de margens cirúrgicas positivas de tumores removidos por dermatologistas são mais baixas do que as removidas por outros especialistas.

Nossos achados mostraram a imunomarcação com Ber-EP4 acentuada e com padrão homogêneo em todos os subtipos histológicos de CBC. Nesta análise, o escore (intensidade x % de área) do CBC nodular foi menor comparados ao do esclerodermiforme (p= 0,04), o que pode sugerir menor expressão desta proteína no CBC nodular. O marcador Ber-Ep4 tem sido utilizado no auxílio da diferenciação do CBC com o carcinoma espinocelular e do CBC metatípico.

O anticorpo anti-MNF116 mostrou marcação semelhante à do anti-Ber-EP4, que foi subjetivamente avaliado como mais homogêneo entre todos os subtipos de CBC. Já o escore obtido com o MNF116 sugere possível diferenciação entre os CBC agressivos daqueles não agressivos (nodular marcou menos que esclerodermiforme – p= 0,01 – e micronodular – p= 0,005), o que pode indicar algum auxílio nesta discriminação, além da identificação de ninhos de células tumorais em meio à fibrose e infiltrado inflamatório nos subtipos mais agressivos. No entanto, MNF116 é também marcador da epiderme, o que pode dificultar a distincão ou delimitação do CBC superficial.

O anticorpo anti-E-Caderina, de modo geral, marcou com menor intensidade comparados aos demais (Ber-Ep4 e MNF116), mas com padrão homogêneo. O escore superior da E-caderina no CBC superficial (em relação ao nodular – p= 0,03) pode estar associado ao fato deste tipo histológico ter crescimento apenas radial e não causar invasão tecidual.

O elevado percentual de células marcadas pelo VEGF no infiltrado peritumoral dos tumores agressivos – esclerodermiforme e micronodular – comparados aos não agressivos – nodular e superficial – é indicativo do papel desta proteína no comportamento mais invasivo destes subtipos do CBC e potencialmente explica a maior taxa de ulceração em CBC nodular, já que este tumor tem maior massa celular e com menor expressão de VEGF.

A acurácia na identificação macroscópica e dermatoscópica das margens do tumor e a familiaridade com a clínica, histopatologia e história natural do CBC, associados à aquisição de habilidades cirúrgicas parecem ser a combinação para o sucesso no tratamento cirúrgico do CBC. Além disso, novos marcadores podem auxiliar tanto na melhor identificação de tumores agressivos, quanto no entendimento de seu comportamento

biológico, o que levaria a um melhor planejamento cirúrgico com maiores taxas de cura da doença.

REFERÊNCIAS

- 1) Neale RE, Davis M, Pandeya N, Whiteman DC, Green AC. Basal cell carcinoma on the trunk is associated with excessive sun exposure. J Am Acad Dermatol. 2007;56:380-6.
- 2) Richmond-Sinclair NM, Pandeya N, Ware RS, Neale RE, Williams GM, van der Pols JC, Green AC. Incidence of basal cell carcinoma multiplicity and detailed anatomic distribution: longitudinal study of an Australian population. J Invest Dermatol. 2009;129:323-8.
- 3) Chen CC, Chen CL. Clinical and histopathologic findings of superficial basal cell carcinoma: A comparison with other basal cell carcinoma subtypes. J Chin Med Assoc. 2006;69:364-71.
- 4) 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.
- 5) Raasch BA, Buettner PG, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. Br J Dermatol. 2006;155:401-7.
- 6) Demers AA, Nugent Z, Mihalcioiu C, Wiseman MC, Kliewer EV. Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. J Am Acad Dermatol. 2005;53:320-8.
- 7) Bandeira AM, Bandeira V, Silva JF, Mazza E. Carcinoma basocelular: estudo clínico e anatomopatológico de 704 tumores. An Bras Dermatol. 2003;78:23-34.
- 8) Telfer N.R, Colver GB, Bowers PW. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. Br J Dermatol. 1999;141:415-423.
- 9) Fleischer AB Jr, Feldman SR, Barlow JO, Zheng B, Hahn HB, Chuang TY, Draft KS, Golitz LE, Wu E, Katz AS, Maize JC, Knapp T, Leshin B. The specialty of the treating physician affects the likelihood of tumor-free resection margins for basal cell carcinoma: results from a multi-institutional retrospective study. J Am Acad Dermatol. 2001;44:224-30.
- 10) Bassas P, Hilari H, Bodet D, Serra M, Kennedy FE, García-Patos V. Evaluation of surgical margins in Basal cell carcinoma by surgical specialty. Actas Dermosifiliogr. 2013;104:133-40.
- 11) Dasgeb B, Mohammadi TM, Mehregan DR. Use of Ber-EP4 and Epithelial Specific Antigen to Differentiate Clinical Simulators of Basal Cell Carcinoma. Biomark Cancer. 2013;5:7-11.
- 12) Prieto VG, Lugo J, McNutt NS. Intermediate- and low-molecular-weight keratin detection with the monoclonal antibody MNF116. An immunohistochemical study on 232 paraffinembedded cutaneous lesions. J Cutan Pathol. 1996;23:234-41.
- 13) Frixen, UH, Behrens, J, Sachs, M, Eberle, G, Voss, B, Warda, A, Lochner, D, Birchmeier, W. E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. J. Cell Biol. 1991;113:173-85.
- 14) 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.

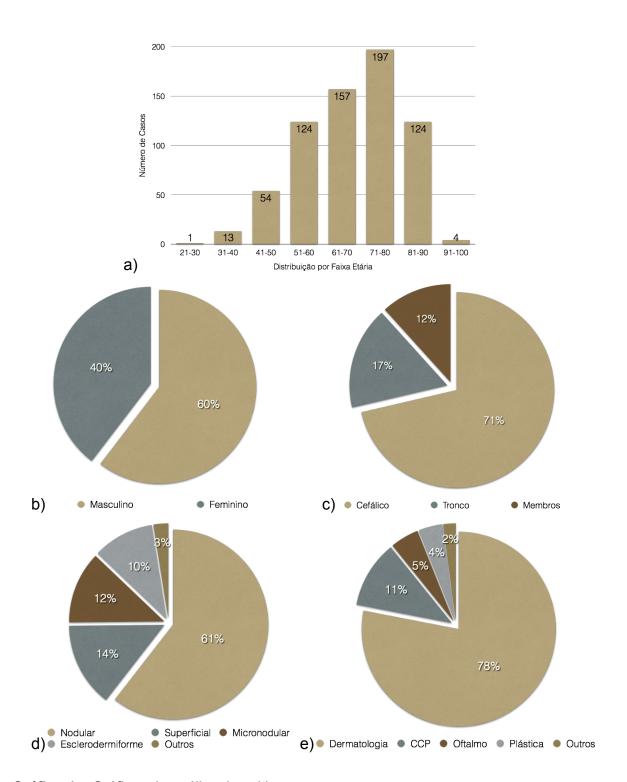


Gráfico 1 – Gráficos da análise descritiva:

(a) Distribuição por faixa etária, dos casos de CBC. (b) Distribuição segundo sexo de casos com diagnóstico de CBC. (c) Distribuição topográfica dos casos de CBC removidos por cirurgia. (d) Distribuição dos tipos histológicos de CBC. (e) Distribuição do percentual das cirurgias para remoção de CBC entre as especialidades. Total de casos n= 674, todos removidos por cirurgia noHCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011.

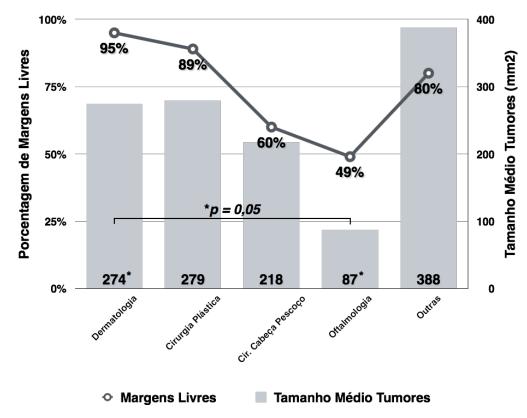
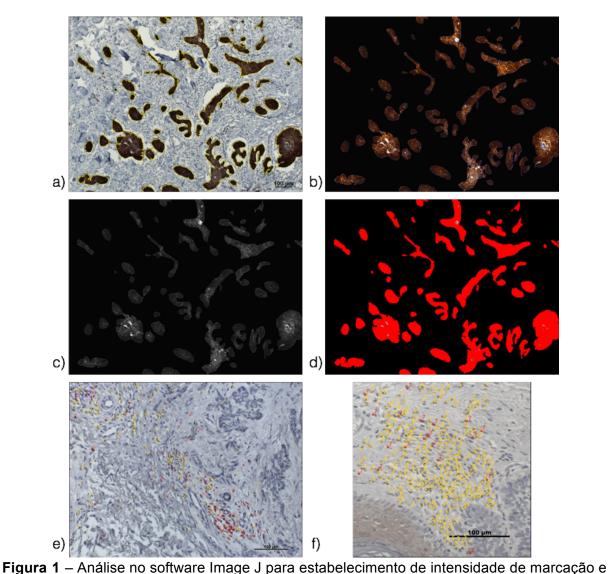


Gráfico 2 – Relação entre dimensão dos tumores excisados (n= 674) e índice de margens livres, em acordo com a especialidade responsável pelo procedimento no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011.

Tabela 1 – Análise do risco para desfecho com margens comprometidas nos CBC excisados (n= 674) por diferentes especialidades no HCFMRP-USP, período de janeiro a dezembro de 2011

o a correlative and	ANÁLISE UNIVARIADA		ANÁLISE MULTIVARIADA	VARIADA
CARACIERISTICAS	OR (IC 95%)	VALOR-P	OR (IC 95%)	VALOR-P
TIPO HISTOLÓGICO				
Nodular	1		1	
SUPERFICIAL	0,1 (0,01-0,71)	<0,001	0,23 (0,03-1,82)	0,166
ESCLERODERMIFORME	2,52 (1,30-4,86)	<0,001	1,90 (0,89-4,05)	0,093
MICRONODULAR	2,93 (1,61-5,34)	<0,001	3,41 (1,71-6,80)	0,001
OUTROS	4,1 (0,72-23,27)	0,113	1,25 (0,20-7,58)	0,808
Localização				
SEGMENTO CEFÁLICO	į į		1	
TRONCO	0,05 (0,01-0,34)	<0,001	0,12 (0,02-0,95)	0,045
MEMBROS	0,07 (0,01-0,50)	<0,001	0,13 (0,02-1,00)	0,051
SEXO				
MASCULINO	1		1	
FEMININO	0,76 (0,43-1,50)	0,223	0,9 (0,50-1,60)	0,678
ULCERAÇÃO				
NÃO	į į		1	
SIM	2,43 (1,50-3,94)	<0,001	1,2 (0,67-2,12)	0,553
IDADE				
<73 ANOS	1		1	
>73 ANOS	1,2 (0,76-2,34)	0,110	0,97 (0,56-1,72)	0,941
ESPECIALIDADE				
DERMATOLOGIA	1		1	
CIRURGIA PLÁSTICA	2,31 (0,65-8,16)	0,170	1,77 (0,40-6,64)	0,393
CIRURGIA CABECA E PESCOCO	13,0 (7,14-23,75)	<0,001	9,7 (5,14-18,21)	0,001
OFTALMOLOGIA	16,3 (7,4-36,1)	<0,001	10,1 (4,40-23,3)	0,001
OUTRAS	3,81 (0,66-14,5)	0,170	3,90 (0,71-21,25)	0,115
ТАМАИНО			1,0 (0,99-1,01)	0,770



porcentagem de células marcadas pela IHQ.

(a) CBC esclerodermiforme corado pelo Ber-EP4 e demarcado pelo software;

(b) Remoção do background para análise restrita da área tumoral; (c) Imagem em 8-bits para análise na escala de cinza; (d) Análise do limiar (threshold) para quantificação de células marcadas pelo Ber-EP4. (e) Contagem de células marcadas com o anticorpo anti-VEGF – em amarelo células inflamatórias negativas e em vermelho as células positivas para VEGF.

Software Image J v1.49 – Aumento 200x. (f) Aumento 400x.

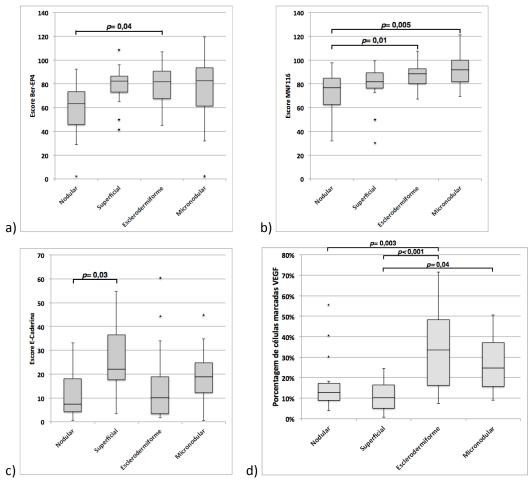


Gráfico 3 – Análise gráfica por box plot da imuno-marcação de Ber-EP4, MNF116, E-Caderina e VEGF nos quatro tipos histológicos de CBC.
 (a) Escore do anticorpo Ber-EP4 mostrando diferença entre esclerodermiforme e nodular. (b) Escore do anticorpo MNF116 mostrando diferença entre nodular e esclerodermiforme e nodular e micronodular. (c) Escore do anticorpo E-Caderina mostrando diferença entre nodular e superficial. (d) Porcentagem de marcação do anticorpo VEGF mostrando diferença entre agressivos (esclerodermiforme e micronodular) e não agressivos (superficial e nodular).