

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

JULIANA DE ANDRADE CINTRA

**Invasão orbitária por carcinoma basocelular palpebral: epidemiologia,
fatores clínicos, histopatologia e perfil imuno-histoquímico dos casos
submetidos à exenteração em um hospital de referência**

Ribeirão Preto
2016

JULIANA DE ANDRADE CINTRA

Invasão orbitária por carcinoma basocelular palpebral: epidemiologia, fatores clínicos, histopatologia e perfil imuno-histoquímico dos casos submetidos à exenteração em um hospital de referência

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.
Área de Concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Fernando Chahud

Versão Corrigida

**Ribeirão Preto
2016**

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.

Cintra, Juliana de Andrade

Invasão orbitária por carcinoma basocelular palpebral: epidemiologia, fatores clínicos, histopatologia e perfil imuno-histoquímico dos casos submetidos à exenteração em um hospital de referência. Ribeirão Preto, 2016.

65 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia.

Orientador: Chahud, Fernando

1. Carcinoma basocelular. 2. Exenteração orbitária. 3. Biomarcadores. 4. Imuno-histoquímica. 5. Epidemiologia.

CINTRA, J. A. Invasão orbitária por carcinoma basocelular palpebral: epidemiologia, fatores clínicos, histopatologia e perfil imuno-histoquímico dos casos submetidos à exenteração em um hospital de referência. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Chahud

Assinatura: _____

Prof. Dr. Antônio Augusto Velasco e Cruz

Assinatura: _____

Prof. Dr. Luis Antônio Gorla Marcomini

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICO esta dissertação e agradeço a Deus pela oportunidade concedida de poder observar mais de perto este espetáculo que é a natureza em diversas de Suas manifestações.

Dedico aos meus pais, Jair (*in memoriam*) e Maria Aparecida, a quem simplesmente devo tudo que sou e que em meio a tantas dificuldades conseguiram me entregar ao mundo, para que eu realizasse tudo o que eu julgava impossível.

Às minhas irmãs, Fernanda e Monise, sempre presentes em minha vida.

Ao meu noivo e futuro marido Luis Daniel pela paciência e compreensão em relação a momentos em que infelizmente não estive presente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Chahud pela proposição do desafio de levar adiante este projeto e pela orientação sempre presente durante todo o trabalho.

À Dra. Mariângela pela solicitude e presteza sempre presentes nos momentos mais difíceis.

Aos secretários Camila, Rosângela e Rodrigo e funcionárias Laura, Márcia e Mônica pela competência, dedicação e gentileza com que sempre me auxiliaram nesses vários anos.

Ao querido amigo José Luiz de Souza pelo incentivo sempre e exemplo de pessoa e profissional.

À Dora Lúcia pelo grande incentivo, oportunidade de crescimento profissional e pessoal durante os vários anos na Universidade de Franca.

À minha amiga Géssica Andrade pelo apoio e auxílio prestado no desenvolvimento desse estudo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Zucoloto (*in memorian*) que me concedeu a oportunidade de me abrir os caminhos sem questionar, sempre dando o apoio necessário para que neles trilhasse.

À minha querida e saudosa amiga Christianne Dezuani Dias de Oliveira (*in memorian*), que esteve comigo desde o início dessa caminhada e tenho certeza que está agora nos céus comemorando mais essa etapa de minha vida.

À minha inspiradora como pessoa, mulher e profissional Dra. Heloisa Rached (*in memorian*), que sempre me incentivou e colocou-se sempre à disposição.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no apoio para desenvolvimento desse projeto.

Ao CNPq (processo nº 455328/2014-5) pelo auxílio na realização desse projeto.

À todos que colaboraram e apoiaram de forma direta e indireta a elaboração desse trabalho e que contribuíram para o meu crescimento intelectual.

Com Deus existindo, tudo dá esperança: Sempre um milagre é possível, o mundo se resolve. Mas se não tem Deus, há de a gente perdidos no vai-vem, e a vida é burra. Tendo Deus, é menos grave se descuidar um pouquinho, pois, no fim dá certo. Mas, se não tem Deus, então, a gente não tem licença de coisa nenhuma!

João Guimarães Rosa

RESUMO

CINTRA, J.A. CHAHUD, F. **Invasão orbitária por carcinoma basocelular palpebral: epidemiologia, fatores clínicos, histopatologia e perfil imuno-histoquímico dos casos submetidos à exenteração em um hospital de referência.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O carcinoma basocelular (CBC) é uma neoplasia cutânea maligna de baixo potencial metastatizante, originada das células da camada basal da epiderme. Sua importância clínico-epidemiológica pode ser constatada pelo fato de constituir a neoplasia maligna mais comum na espécie humana, cujo principal fator etiológico é a exposição à radiação ultravioleta. Apesar da baixa incidência de metástases, a neoplasia pode adotar um comportamento localmente agressivo, com comprometimento de estruturas profundas e de forte apelo estético, como ocorre na região periocular. Uma das complicações advindas de sua infiltração neste sítio anatômico consiste na invasão de tecidos orbitários cujo tratamento é a exenteração, conduta mutiladora que consiste na retirada do globo ocular e das partes moles da órbita acometida. O objetivo deste estudo foi avaliar os casos de CBC com invasão orbitária que foram submetidos à exenteração no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto, no período de 1992 a 2012, para a possível identificação de fatores clínicos e morfológicos que possam prever uma evolução desfavorável da neoplasia. Foi realizada uma coleta de dados clínicos, epidemiológicos e histopatológicos dos casos submetidos à exenteração a partir dos prontuários médicos dos pacientes. As lâminas referentes aos exames anátomo-patológicos foram revistas e foi realizado estudo imuno-histoquímico para os marcadores p53, bcl-2, actina de músculo liso e metaloproteinase-1. O grupo controle foi composto por pacientes com diagnóstico da neoplasia em topografia periocular, sem sinais de invasão orbitária. Para os casos com invasão orbitária o número de casos positivos marcados para p53 (0,21) e para actina de músculo liso (0,21) foi significativamente menor que o número de casos positivos para bcl-2 (0,63) e MMP-1 (0,58) ($p=0,0331$). Entretanto, o número de casos positivos para bcl-2 (0,63) foi significativamente maior que o número de casos marcados por MMP-1 (0,58) ($p=0,0126$). Para os tumores sem invasão orbitária, o número de casos positivos para p53 (0,31) e actina (0,31) foi significativamente menor que o número de casos positivos para bcl-2 (0,63) e MMP-1 (0,50) ($p=0,0273$). Os resultados indicam que a invasão orbitária por carcinoma basocelular palpebral ocorre com maior frequência no sexo masculino, em pacientes com longa história clínica de múltiplas lesões e submetidos a múltiplos procedimentos. Além disso, os marcadores estudados aparentemente não podem prever um comportamento mais agressivo do tumor.

Palavras-chave: Carcinoma basocelular; Exenteração orbitária; Biomarcadores; Epidemiologia.

ABSTRACT

CINTRA, J.A. CHAHUD, F. **Orbital invasion by basal cell carcinoma of the eyelid: epidemiology, clinical factors, histopathology and immunohistochemical profile of cases submitted to exenteration in a reference hospital.** 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Basal cell carcinoma (BCC) is a malignant skin cancer of low metastasizing potential originated from the basal cells of the epidermis. Its clinical and epidemiological importance is evidenced by the fact that it is the most common malignancy in humans and it has as the main etiological factor the exposure to ultraviolet radiation. Despite the low incidence of metastases, the cancer can adopt a locally aggressive behavior with involvement of deep structures and it can have a strong aesthetic appeal, as in the periocular region. One of the complications arising from its infiltration in this anatomical site consists of orbital tissue invasion whose treatment is exenteration, a mutilating procedure consisting of the removal of the eyeball and the soft tissue of the affected orbit. The aim of this study was to evaluate the cases of BCC with orbital invasion that underwent exenteration at the Clinics Hospital of Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, from 1992 through 2012, for possible identification of clinical and morphological factors that can predict an unfavorable evolution of the tumor. The clinical data were obtained from the patients' charts and we have reviewed all the slides from exenteration specimens and performed immunohistochemical studies with p53, bcl-2, smooth muscle actin and metalloproteinase-1(MMP-1). The control group consisted of age-matched patients with eyelid basal cell carcinomas without orbital invasion. For cases with orbital invasion the number of positive cases labeled for p53 (0.21) and actin (0.21) was significantly lower than the number of positive cases for bcl-2 (0.63) and MMP -1 (0.58) ($p = 0.0331$). However, the number of positive cases for bcl-2 (0.63) was significantly greater than the proportion of positive cases for MMP-1 (0.58) ($p = 0.0126$). For cases without orbital invasion the number of positive cases for p53 (0.31) and actin (0.31) was significantly lower than the number of positive cases for bcl-2 (0.63) and MMP-1 (0.50) ($p = 0.0273$), even though the number of positive cases marked for MMP-1 (0.50) was not significantly different from number of positive cases for bcl-2 (0.63) ($p = 0.059$). The results indicate that orbital invasion of basal cell carcinoma of the eyelid was more frequent in male sex and that the patients have usually a long history of multiple lesions and were submitted to several procedures. In addition, our results suggest these markers can not predict an aggressive behavior for basal cell carcinomas of the periocular region.

Keywords: Basal cell carcinoma; Orbital exenteration ; Biomarkers ; Epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração das camadas da pele humana	16
Figura 2 -Corte histológico de pele humana, evidenciando as camadas da pele	16
Figura 3 - Marcação com bcl – 2	39
Figura 4 - Marcação com p53	39
Figura 5 - Marcação com MMP – 1	40
Figura 6 - Marcação com actina de músculo liso	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Anticorpos e reagentes.....	31
Tabela 2- Resultados Imunomarcção dos 19 casos de CBC com invasão orbitária.....	41
Tabela 3- Resultados Imunomarcção dos 38 casos de CBC sem invasão orbitária.....	41
Tabela 2 -Resultados clínicos dos 19 casos de CBC com invasão orbitária	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição segundo sexo dos casos (n=19) com diagnóstico de CBC com invasão orbitária e posterior exenteração orbitária, no HCFMRP-USP, período de janeiro de 1992 a julho de 2012.....36

Gráfico 2 - Distribuição por idade, dos casos (n=19) com diagnóstico de CBC com invasão orbitária e posterior exenteração orbitária, no HCFMRP-USP, período de janeiro de 1992 a julho de 2012 [n / %].....37

Gráfico 3 -Distribuição dos subtipos histológicos de carcinoma basocelular, dos casos (n=19) com diagnóstico de CBC com invasão orbitária e posterior exenteração orbitária, no HCFMRP-USP, período de janeiro de 1992 a julho de 2012.....38

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

bcl-2	Linfoma de célula B 2 (<i>B cell lymphoma 2</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CBC	Carcinoma basocelular
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECM	Matriz extracelular
F	Feminino
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCRP	Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
M	Masculino
MMP-1	Metaloproteinase de matriz 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
SERPAT	Serviço de Patologia
TBS	<i>Tween phosphate buffered saline</i>
TE	Tricoepitelioma
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

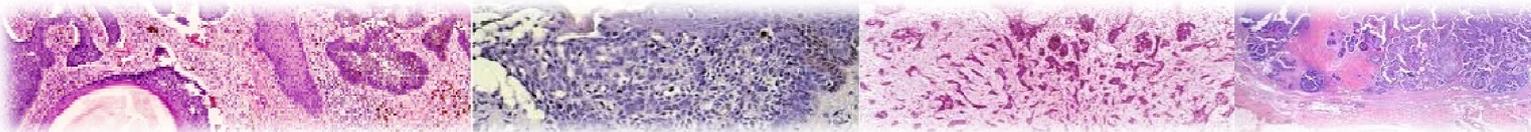
LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
nm	nanômetro
μm	micrômetro
mMol/l	milimolar por litro
n	número
<	menor
>	maior

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Carcinoma basocelular.....	15
1.1.1	Epidemiologia e etiopatogenia.....	15
1.1.2	Manifestações clínicas.....	19
1.1.3	Histopatologia do Carcinoma basocelular.....	19
1.1.3.1.	Tumores cutâneos.....	19
1.1.3.2	Métodos diagnósticos de tumores.....	21
1.2	Fatores prognósticos do CBC.....	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivos gerais.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Delineamento experimental.....	29
3.3	Análise de riscos e benefícios.....	32
3.4	Aspectos éticos.....	32
3.5	Avaliação imuno-histoquímica e análise dos resultados.....	33
3.6	Análise estatística.....	34
4	RESULTADOS	36
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	48
7	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma basocelular

1.1.1 Epidemiologia e etiopatogenia

Histologicamente a pele é formada por 3 camadas, sendo a epiderme, a derme e a hipoderme. A epiderme é a camada mais superficial e contém queratinócitos, células basais e melanócitos. As células basais constituem a camada basal e dividem-se para garantir a renovação da epiderme. Com as consecutivas divisões, parte das células basais permanecem nesta camada, mantendo-a, enquanto outras células filhas migram para as camadas superiores da epiderme, ao mesmo tempo em que diferenciam-se em queratinócitos e posteriormente formam queratina. A espessura e a estrutura da epiderme variam de acordo com o local estudado, sendo mais espessa e complexa na palma da mão e planta do pé e apresenta as seguintes camadas: camada basal (constituída por células prismáticas ou cubóides), camada espinhosa (constituída por células poligonais, cubóides ou ligeiramente achatadas), camada granulosa (constituída por células poligonais achatadas), camada lúcida (constituída por uma delgada camada de células achatadas, eosinofílicas, hialinas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas desapareceram) e a camada mais superficial da pele que é composta apenas de células mortas e grandes quantidades de queratina e é denominada camada córnea. Intercalados às células basais e também adjacentes à lâmina basal encontram-se os melanócitos. Estas células sintetizam melanina e a distribuem através da secreção de melanosomas aos queratinócitos (Souto et al., 2006; Junqueira; Carneiro, 1999).

As figuras 1 e 2 demonstram as camadas da pele.

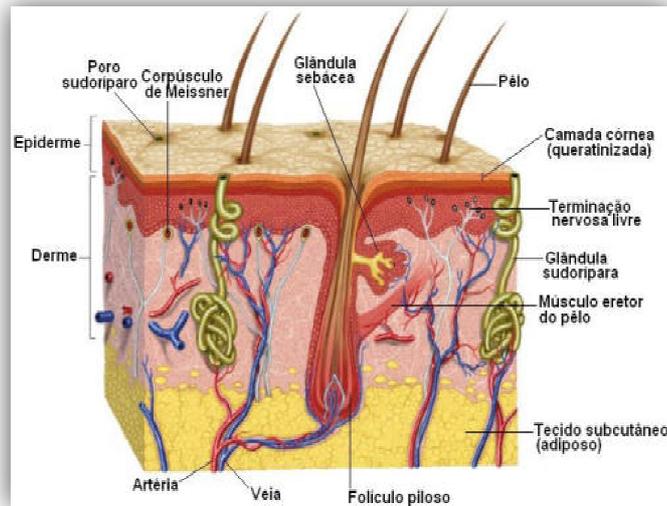


Figura 1 – Ilustração das camadas da pele humana.

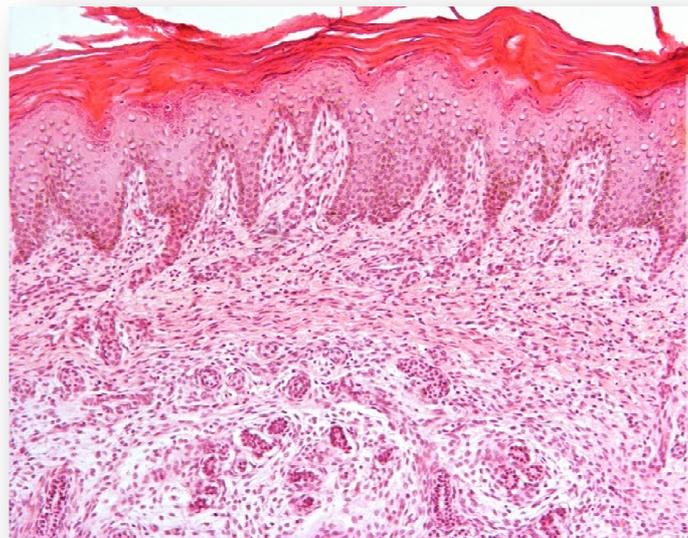


Figura 2 – Corte histológico de pele humana, evidenciando as suas camadas.

O carcinoma basocelular (CBC), descrito pela primeira vez por Jacob em 1827, é uma neoplasia maligna caracterizada pela proliferação de células com fenótipo basalóide (células germinativas das camadas mais profundas da epiderme), assumindo formas clínicas diversas. Geralmente, apresenta-se como pápula de brilho peroláceo e com teleangiectasias, podendo ulcerar e exibir diversos graus de pigmentação. Suas variantes adotam aspecto plano, multinodular e/ou infiltrativo,

com intensa reação inflamatória associada. Do ponto de vista histopatológico, o CBC caracteriza-se por apresentar estruturas colunares, cordões e aglomerados celulares com arranjo periférico dos núcleos em paliçada, atipias leves, degeneração mixóide e fendas de retração (Kossard et al., 2006).

A identificação das neoplasias cutâneas é um dos exercícios mais frequentes na prática rotineira do patologista cirúrgico. Os critérios morfológicos para a diferenciação entre as neoplasias cutâneas mais comuns, que são o carcinoma basocelular, o melanoma e o carcinoma espinocelular, são bastante consistentes. Porém, quando comparamos o CBC, a neoplasia cutânea mais frequente, com as neoplasias cutâneas primárias do folículo piloso (benignas e malignas), particularmente o tricoepitelioma (TE), algumas semelhanças somadas a artefatos de amostragem (amostras exíguas em biópsia incisionais ou amostras parcialmente danificadas por artefatos de esmagamento ou fulguração) podem provocar situações de dificuldade diagnóstica (Carr et al., 2007).

A exposição ao sol possui um papel no desenvolvimento do CBC (Crowson,1996). Pacientes com fenótipos de pele clara são particularmente predispostos, incluindo-se também pacientes com olhos azuis, cabelos vermelhos e presença de sardas (Goldberg, 1996), bem como aqueles cuja atividade ocupacional ou recreativa proporciona exposição ao sol forte, por período prolongado. O CBC é raroem negros e índios (Pandy et al., 2010). Outros fatores ambientais de risco implicados são a exposição a materiais pesados como o arsênico, derivados de carvão, e a exposição à radiação ionizante, sendo a luz ultravioleta (UV) o fator mais importante no desenvolvimento e progressão de lesões (Crowson,1996; Goldberg, 1996; CARTER; Lin, 1993; Goldstein, et al., 1993; Johnson, et al., 1994; Walling et al., 2004).

A luz UV compreende energias com comprimento de onda variando entre 200 a 400 nm, subdividindo-se em bandas ultravioleta A (UVA), ultravioleta B (UVB) e ultravioleta C (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. É reconhecido um período de latência de 20 a 50 anos entre o dano do DNA causado pela luz UV e a manifestação clínica do tumor (Situm et al., 2008).

O CBC afeta principalmente as áreas expostas ao sol, tais como cabeça e pescoço (88 a 90% dos casos), especialmente as regiões de pálpebra e nariz e ocorre principalmente em idosos, sendo mais comum em homens. O CBC possui crescimento lento e é considerado um tumor com capacidade de invasão e destruição tecidual localmente, raramente provocando metástase (0,0028 a 0,5%). Deste modo, o CBC raramente leva o indivíduo a óbito, embora casos raros com potencial metastático são descritos na literatura (Pandy et al., 2010). O CBC que ocorre em paciente jovem (menos de 35 anos de idade) pode ter um curso clínico agressivo (Crowson, 2006; Pandy et al., 2010; Nakayama et al., 2011).

Walling e colaboradores, realizaram uma pesquisa em 2004, onde mostram que o CBC é uma lesão de etiologia multifatorial, isto é, sua gênese compreende uma combinação de fatores genéticos e ambientais como etnia, comorbidades, predisposição individual e exposição à radiação ultravioleta, o que pode ser confirmado pela maior incidência do tumor em áreas próximas à Linha do Equador. A radiação UVB promove danos diretos ao material genético nuclear, levando à formação de pontes covalentes entre bases pirimidínicas e, conseqüentemente, à síntese de produtos mutagênicos e radicais livres que promovem ativação de oncogenes e inibição de elementos reguladores do ciclo celular (Walling et al, 2004).

O CBC é considerado o câncer de pele mais comum, representando 70 a 75% dos casos. Existem cinco tipos clínicos de carcinoma basocelular: CBC nódulo ulcerativo, incluindo úlcera roedora, CBC superficial, CBC morféico, CBC pigmentado e o fibroadenoma. As lesões nódulo ulcerativas são mais comuns, representando 75% dos casos de CBC, e 10% dos casos de CBC superficial (Padgett; Hendrix, 2001; Kirkuam, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde(OMS), a incidência do CBC aumenta 10% a cada ano em todo mundo, sugerindo que, em breve, a prevalência desta entidade será equivalente ao somatório de todas as outras neoplasias. Embora seja uma lesão maligna, as metástases são pouco frequentes, ocorrendo em menos de 0,01% dos casos. Contudo, a possibilidade de acometimento localmente agressivo e as altas taxas de recorrência demandam atenção especial à abordagem desta neoplasia (Boulinguez et al., 2004). Estima-se que cerca de 40% dos pacientes com um carcinoma primário apresentarão uma nova lesão dentro de 5 anos (Shanti et al., 2010). As lesões que recorrem após a radioterapia podem infiltrar

amplamente antes de tornarem-se clinicamente aparentes, por isso a radioterapia é reservada para tumores de crescimento agressivo e, em caso de recidiva do CBC pós radiação, deve-se aumentar a suspeita de infiltração perineural (Sahl, 1995).

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. O acometimento perineural ocorre em aproximadamente 50% dos casos de CBC perioculares. Nestas situações, podem ser encontrados sintomas álgicos, parestesias e paralisias (Leibovitch et al., 2005).

As lesões desses tumores de crescimento agressivo, em raras ocasiões, manifestam-se com sintomas de maior sensibilidade ou dor local, a qual pode indicar infiltração perineural. O comprometimento sensorial tem sido relatado particularmente em lesões pré-auriculares e em áreas de bochecha (Niazi; Lamberty, 1993). Os sítios de origem mais frequentes são as pálpebras e o canto medial. Aproximadamente 95% dos CBCs ocorrem entre 40 e 79 anos, com média de faixa etária para diagnóstico de 60 anos de idade (Pandy et al., 2010). Sua relevância epidemiológica pode ser constatada pelo fato de constituir a neoplasia mais comum na população caucasiana, acometendo predominantemente a população adulta. Sabe-se que é um tumor de crescimento lento e progressivo, com baixo risco de metástases, porém pode apresentar comportamento agressivo localmente.

1.1.3 Histopatologia do carcinoma basocelular

1.1.3.1. Tumores cutâneos

A incidência de metástases e / ou morte correlacionam-se com tumores maiores que 3 cm de diâmetro, nos quais, os pacientes possuem um risco de 1 a 2% de metástases, e aumenta até um máximo de 20 a 25% nas lesões maiores que 5 cm e até 50% nas lesões maiores que 10 cm de diâmetro. O CBC maior que 5 cm de diâmetro é considerado “gigante” e possui um risco significativo de morbidade e mortalidade (Crowson, 2006).

Por meio do exame anátomo-patológico, identificam-se diversos padrões morfológicos, dentre os quais podemos citar os tipos nodular, superficial, micronodular, esclerosante, adenoide, dentre outros. Cada subtipo possui implicações que serão determinantes para definir a melhor conduta terapêutica e a evolução do paciente. Algumas variantes, como o micronodular e o esclerosante, possuem sabidamente risco de comportamento mais agressivo em relação às demais (Wya et al, 2010; Santa Cruz, 2008).

O diagnóstico precoce é essencial para melhorar o tratamento de pacientes com tipos agressivos de CBC. Não há um único marcador imuno-histoquímico específico disponível para distinguir os CBCs agressivos dos não-agressivos (Ansarin, et al., 2006). Foi demonstrado que o padrão de crescimento e o subtipo histológico do tumor estão relacionados com o comportamento agressivo (Walling HW et al., 2004; Dixon et al., 1989; Rippey et al., 1988). Segundo Panuncio et al. , 2003; Staibano et al., 2001; Barbaud et al., 1998; Healy et al., 1995, têm sido avaliado as associações de agressividade tumoral com o índice proliferativo, ciclo celular, apoptose de marcadores relacionados com as proteínas de diferenciação dos queratinócitos, a diminuição do número de fibras nervosas dentro do tumor e o aumento da vascularidade, porém os resultados não são relevantes. A identificação de marcadores específicos associados com o comportamento agressivo em CBC pode resultar em um diagnóstico precoce e melhores oportunidades para intervenções terapêuticas (Ansarin, et al., 2006).

De acordo com Boulinguez et al. (2004), a taxa geral de recorrência do CBC é de 12%. Sabe-se que 24% dos casos recorrentes possuem características mais agressivas em relação ao anterior. Contudo, as taxas podem ser superiores a 75% em localizações como as regiões nasal, periorbitária, auricular e frontal, de modo

que a neoplasia mais agressiva pode acometer estruturas vitais e de forte apelo estético e difícil abordagem terapêutica, como a região periocular.

Os CBCs constituem a neoplasia periocular mais comum, representando mais de 90% dos tumores desta região. Os fatores de risco envolvidos em sua patogênese são os mesmos para os demais sítios. Devido à sua peculiar localização, devem ser abordados com extrema cautela, devido à sua alta taxa de recorrência. Foi demonstrado que cerca de 30% dos casos de CBC periorculares abordados em hospitais de referência já haviam sido submetidos à abordagem terapêutica prévia em outro serviço. Deste modo, a neoplasia adquire padrão mais agressivo, influenciada por fatores como a resposta imunológica do paciente, o fenótipo da neoplasia e a invasão de tecidos profundos (Soysal et al, 2008). O papel da imunidade comprometida em provocar um aumento do risco de CBC, pode ser devido à diminuição da vigilância imunológica de vírus oncogênicos (Oram, et al., 1995). As genodermatoses que aumentam o risco de CBC incluem o protótipo xeroderma pigmentoso, a Síndrome de Rasmussen, a Síndrome Rombo, a Síndrome Bazex-Christol-Dupre, o albinismo e a doença de Darier (Carter; Lin, 1993; Johnson, et al., 1994; Rao et al., 1994). Estas síndromes variam ou diminuem a pigmentação epidérmica e, assim, aumentam o risco de transformação oncogênica ou de ocorrência de instabilidade genotípica na epiderme induzida por luz UV (Crowson,1996).

1.1.3.2 Métodos diagnósticos de tumores

O diagnóstico de tumores é certamente um dos grandes desafios enfrentados pela medicina contemporânea. Nas últimas décadas, o número de testes diagnósticos disponíveis tem crescido consideravelmente e, assim como para as tecnologias médicas em geral, os novos testes diagnósticos devem ser rigorosamente avaliados previamente à sua introdução na prática diária. O número de estudos sobre os testes de diagnóstico tem aumentado nos últimos anos, porém muitos destes têm apresentado qualidade metodológica questionável. Repetidamente poucos estudos preenchem todos os critérios metodológicos,

dificultando a validação da interpretação e a aplicabilidade dos resultados encontrados (Kilpatrick; Geisinger, 1998).

Dos diversos critérios de diagnóstico, o exame histopatológico avalia o grau de diferenciação celular, número de mitoses, características citológicas, morfológicas e estruturais. Entretanto, a biópsia convencional apresenta algumas desvantagens como a necessidade de remoção do tecido a ser analisado, a não obtenção do resultado imediato e as alterações bioquímicas no tecido biopsiado quando este não é adequadamente armazenado.

O diagnóstico histopatológico baseia-se nas anormalidades morfológicas (Murali et al., 2006; Choi et al., 2005; Koss, 1989) e não nas alterações bioquímicas do tecido (Manoharan et al., 1996). Dessa forma, tem-se buscado o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais rápido e preciso (Choi et al., 2005).

É de consenso geral que o objetivo básico ao se fazer o diagnóstico anátomo-clínico do tumor consiste em sua erradicação total por meio de um método cujo custo-benefício seja aceitável para o paciente. A abordagem muitas vezes envolve uma equipe multiprofissional que engloba áreas como Dermatologia, Oftalmologia e Cirurgia Plástica. O exame histopatológico é de fundamental importância para a classificação da neoplasia e a definição de margens de segurança, permitindo assim que a conduta seja direcionada para evitar futuras complicações ligadas ao tratamento inadequado, como a extensão para outros sítios anatômicos (Shinder et al., 2007). Uma das mais temidas complicações do tumor em topografia periocular consiste na extensão da lesão para a órbita, que ocorre em menos de 5% dos casos. Tal quadro representa cerca de 10% dos tumores secundários da órbita, os quais, por sua vez, perfazem 69% das malignidades nesta região. Geralmente, tais casos apresentam-se clinicamente como uma massa periocular, que pode encontrar-se ou não fixada ao osso e infiltrar o tecido muscular (Leibovitch et al., 2005).

O manejo terapêutico destas lesões é desafiador, requerendo uma abordagem ampla e individualizada, considerando-se as características clínico-patológicas inerentes a cada caso. Em casos avançados, opta-se pela realização da exenteração, cirurgia mutiladora que compreende a retirada do globo ocular e das estruturas orbitárias acometidas. Sabe-se que tumores de longa duração,

geralmente negligenciados ou removidos incompletamente, são aqueles mais propensos a necessitarem de terapêutica mais agressiva. Acredita-se que a maioria destes casos poderia ter sido abordada anteriormente, porém os fatores já mencionados, dentre outros aspectos, contribuem para que o paciente seja submetido a uma cirurgia desfigurante, com sérias repercussões clínicas e psicológicas (Shinder et al., 2007; Leibovitch et al., 2005).

1.2 Fatores prognósticos do CBC

O mecanismo molecular detalhado das células tumorais do CBC ainda não foi esclarecido, mas é proposto que a alteração do processo de apoptose esteja relacionada com o surgimento do tumor, já que a “morte celular programada” é responsável pelo processo fisiológico de renovação e manutenção da homeostase do epitélio de superfície (Antonson; Martinou, 2000). O estabelecimento de marcadores preditivos podem ajudar a melhorar a abordagem terapêutica do CBC. Os possíveis candidatos são proteínas envolvidas na apoptose, tais como a p53, um supressor de tumores que é frequentemente mutado em tumores humanos e a bcl-2, uma proteína anti-apoptótica. A correlação entre expressão da p53 e comportamento agressivo dos CBCs já foi relatada (Auepemkiate, 2002). Em contraste, os elevados níveis de bcl-2 parecem estar associados ao lento crescimento tumoral (Ramdial PK et al., 2000).

Dentre os aspectos ligados à expressão de marcadores moleculares, sabe-se que uma evolução desfavorável da lesão está associada a mutações nos oncogenes c-ras e c-fos, expressão aumentada de componentes como as metaloproteinases, actina de músculo liso e da proteína p53, e aumento na expressão de determinados proteoglicanos e da proteína antiapoptótica bcl-2. Tais marcadores podem ser avaliados na rotina de patologia cirúrgica por meio de técnicas de biologia molecular e do método de imuno-histoquímica. Além disso, o prognóstico do CBC é definido por uma série de outros fatores, como o maior diâmetro da neoplasia, invasão perineural, sua localização, o número de lesões apresentadas pelo paciente, a resposta imune do indivíduo e a presença de tumor residual após excisão cirúrgica

(Cohen, 2006; Walling et al., 2004; Rohbach et al., 2001; Kerkela, 2003; Ansarin et al., 2006).

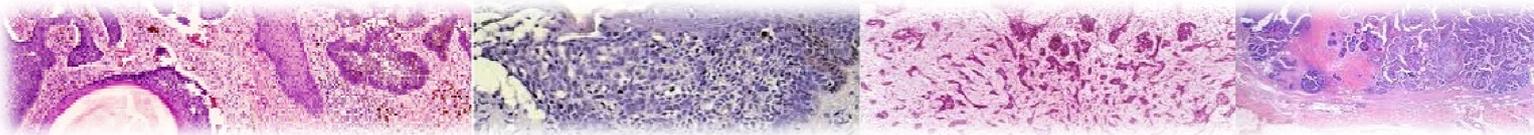
O p53 é um gene de supressão tumoral cujas mutações possuem papel crucial na gênese de muitas neoplasias, dentre elas os tumores cutâneos (Kerkela, 2003). Vários estudos relataram sobre a expressão da proteína p53 em 40-90% dos CBCs (Shea et al., 1992; Barbareschi et al., 1992; Barrett et al., 1997; Boonchai et al., 2000). O papel das mutações do gene p53 na patogênese do CBC (Lacour, 2002) e sua associação com a capacidade de invasão tumoral em vários outros tumores epiteliais, como carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, torna este gene um possível candidato para prever o comportamento agressivo em CBCs (Shin, et al., 1996).

O gene bcl-2 desempenha um importante papel regulador que interage com mecanismos pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, e anormalidades em sua expressão podem resultar na perpetuação de mutações e contribuir para a tumorigênese (Antonson; Martinou, 2000; Brada, 1992), uma vez que a proteína bcl-2 é uma proteína antiapoptótica envolvida no controle do ciclo de divisão celular. Mutações no gene que codifica tal componente têm relevância prognóstica na evolução do carcinoma basocelular (Walling et al., 2004). Com poucas exceções, a alta expressão de proteína bcl-2 está associada com um resultado desfavorável em tumores epiteliais (Ramdial et al., 2000).

Os CBCs do subtipo esclerosante têm um alto risco de recorrência após a radioterapia. A degradação e remodelação da matriz extracelular (ECM) é um passo essencial na migração, invasão e metástase de células tumorais. Este processo é mediado principalmente por duas famílias de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os componentes do sistema de ativação do plasminogênio (Stetler et al., 1993). Deste modo, a metaloproteinase de matriz tipo 1 (MMP-1), a qual é um subtipo de protease envolvida no processo de remodelamento da matriz extracelular, pode desempenhar papel relevante na progressão das neoplasias (Ansarin et al., 2006). Além disso, foi detectada uma alta frequência de mutação do p53 e baixa expressão de bcl-2 neste subtipo histológico de CBC (Zagrodnik et al., 2003).

Outro marcador avaliado é a actina de músculo liso, uma proteína componente de microfilamentos do citoesqueleto, envolvida no processo de migração celular, essencial para a infiltração neoplásica em subtipos de carcinomas basocelulares de pior prognóstico (Pilloni et al., 2009).

2 OBJETIVOS



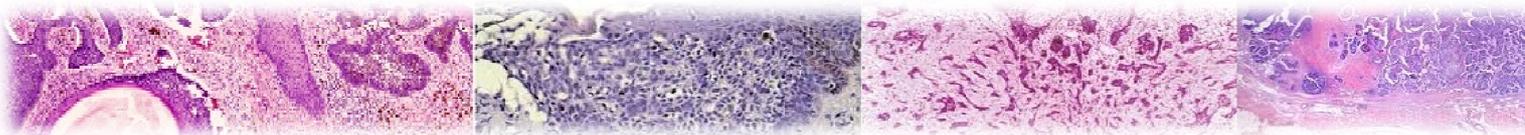
2.1 Objetivos gerais

O presente estudo retrospectivo teve como objetivo avaliar os dados epidemiológicos, clínicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos de 19 casos de carcinoma basocelular da área periocular que motivaram exenteração no Serviço de Oftalmologia do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto, no período compreendido entre 1992 e 2012.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar o perfil de amostra dos indivíduos com carcinoma basocelular da região periocular submetidos à exenteração orbitária;
- ✓ Avaliar as características dos CBCs excisados, tais como a localização, tipo histológico, presença de ulceração e comprometimento de margens;
- ✓ Quantificar e analisar os CBCs, através de estudo imuno-histoquímico, quanto à expressão dos marcadores p53, bcl-2, actina de músculo liso e metaloproteinase tipo 1;
- ✓ Estabelecer relações entre as características do tumor e o painel dos referidos marcadores desse estudo;
- ✓ Fornecer subsídios para a definição do padrão de agressividade destas neoplasias e dos principais fatores de risco envolvidos em sua progressão, permitindo assim o diagnóstico precoce dos casos com maior risco de evolução desfavorável e seu acompanhamento criterioso.

3 MATERIAL E MÉTODOS



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foram estudados, retrospectivamente, dezenove casos de invasão orbitária por carcinoma basocelular com confirmação histopatológica (grupo 1), submetidos à exenteração no Serviço de Oftalmologia (Setor de Oculoplástica) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (FMRP-USP), no período compreendido entre 1992 e 2012.

O grupo controle (grupo 2) foi representado por trinta e oito pacientes com diagnóstico de carcinoma basocelular em topografia periocular, confirmado por meio de exame histopatológico, no período compreendido entre 1992 e 2012, cujas lesões foram totalmente removidas na primeira abordagem cirúrgica. Os pacientes deste grupo não tiveram recorrência da doença ou nova abordagem cirúrgica, após um ano de acompanhamento clínico desde a retirada da lesão inicial. Estes pacientes também não apresentaram nova lesão em outro sítio, cujo diagnóstico tenha sido confirmado por meio de exame anátomo-patológico, no período de um ano após a retirada da lesão periocular.

A análise para escolha dos sujeitos foi realizada por meio de consulta ao arquivo digital do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto (SERPAT/HCRP) que permitiu o acesso aos laudos histopatológicos de todos os pacientes com diagnóstico de CBC que tenham sido abordados neste serviço.

Após a seleção, tendo sido obedecidos rigorosamente os critérios acima explicitados, foi realizada a consulta aos prontuários de cada um dos pacientes. Tanto os casos de invasão orbitária como os controles tiveram uma ficha específica para coleta de dados clínicos, epidemiológicos e histopatológicos (anexos I e II). A análise de dados clínico-epidemiológicos foi efetuada no Arquivo Nosológico do Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto, por meio de autorização previamente concedida aos pesquisadores (vide FICHA SAME), enquanto os dados

histopatológicos foram avaliados por meio de laudos e lâminas arquivados no SERPAT/HCRP. Para os casos que envolveram a realização de exenteração, foram avaliadas todas as ressecções realizadas previamente no serviço, com o intuito de se avaliarem as modificações de comportamento entre os quadros clínicos anteriores e a neoplasia que motivou a invasão orbitária. Foram resgatadas do arquivo do SERPAT, as lâminas e os blocos de parafina referentes a cada um dos pacientes. O material histopatológico foi avaliado por 2 patologistas experientes ligados à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os critérios utilizados para a classificação das neoplasias foram aqueles preconizados pela OMS em sua publicação sobre tumores cutâneos (OMS, 2006).

3.2 Estudo imuno-histoquímico

Posteriormente, após a avaliação clínica e anátomo-patológica, foi realizado o exame imuno-histoquímico das neoplasias (Anexo III). Tal exame objetivou avaliar, em cortes de material parafinado, a presença e expressão de marcadores moleculares de possível relevância para o prognóstico das lesões. Utilizou-se um anticorpo voltado para o marcador que se deseja avaliar e, por meio de adequada coloração, evidenciou-se ou não a expressão ao exame microscópico ótico (Taylor, 2006).

Para as reações de imuno-histoquímica foram utilizados cortes histológicos de 3 µm de espessura depositados em lâminas previamente silanizadas com organossilano 4% em acetona (3-aminopropil trietoxissilano-SIGMA, St Louis, USA), desparafinadas e reidratadas. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram condicionadas em tampão citrato 10mmol/l, pH 6.0, expostas à panela a vapor por 40 minutos, resfriadas em temperatura ambiente e lavadas em tampão fosfato (PBS).

Para a detecção do p53, bcl-2, 1A4 e MMP-1 foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% e PBS por 10 minutos, bloqueio de antígenos com BSA (*Bovine serum albumin*; Sigma Chemical CO P.O. 14508, St. Louis, MO 63178, USA) por 60 minutos.

Os anticorpos primários foram incubados em câmara úmida na geladeira *overnight* (Tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos e reagentes

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Clone</i>	<i>Espécie</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Reagente de marcação</i>
p53	M7001	<i>Mouse</i>	DAKO	1:800	DAB
bcl-2	124	<i>Mouse</i>	DAKO	1:100	DAB
Actina de Músculo liso	1A4	<i>Mouse</i>	DAKO	1:600	DAB
MMP-1	MO887	<i>Rabbit</i>	ABBIOTEC	1:150	DAB

A seguir foram realizadas três lavagens sendo duas com PBS e uma com TBS (10nM phosphate buffered saline pH 7,4, 0,05%, Tween 20); aplicação do anticorpo secundário da Invitrogen (Invitrogen Corporation, 542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA) por 30 minutos. Os cortes histológicos foram incubados pelo HRP polímero conjugado *Ready to Use* da Invitrogen por 30 minutos. Desenvolvimento da marcação imuno-histoquímica foi realizado com 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DBA) (Sigma-Aldrich, GmbH, P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany) diluído em tampão PBS e peróxido hidrogênio 0.036% com tempo de marcação variando de 10 a 15 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris; desidratados e montados com Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

No delineamento experimental foram realizados no total 38 controles, sendo dois para cada caso de invasão orbitária.

Os controles positivos e negativos reagiram como esperado, validando os resultados do trabalho. Este experimento foi realizado em triplicata e os casos que não tiveram resultados coincidentes foram excluídos.

Os casos foram pareados com os controles, os quais apresentavam um mesmo subtipo histopatológico de carcinoma basocelular. Os pacientes que foram submetidos à exenteração tiveram os exames imuno-histoquímicos realizados no corte histológico correspondente à invasão neoplásica da órbita, enquanto os controles foram examinados na lâmina com melhor representatividade da lesão.

Considerando-se os componentes moleculares relatados por estudos prévios como associados a mudanças no prognóstico de casos de CBC, foram empregados

os seguintes marcadores: p53 (gene de supressão tumoral), bcl-2 (proteína antiapoptótica envolvida no controle do ciclo de divisão celular), actina de músculo liso (proteína componente de microfilamentos do citoesqueleto, envolvida no processo de migração celular) e metaloproteinase tipo 1 (subtipo de protease envolvida no processo de remodelamento da matriz extracelular).

Após a realização do exame imuno-histoquímico, as marcações foram interpretadas pela equipe executora do projeto como negativas ou positivas. Foi considerada marcação positiva a marcação que ocorreu em mais de 50% das células neoplásicas, para cada marcador avaliado. Para cada caso, foram avaliados 3-5 campos microscópicos, em aumento de 200X.

Juntamente com informações clínicas, epidemiológicas e anátomo-patológicas, os dados foram descritos e comparados entre os grupos da pesquisa, bem como discutidos com base em outros estudos da literatura científica.

3.3 Análise de riscos e benefícios

Por se tratar de estudo retrospectivo e descritivo, não houve intervenção nas condutas e no acompanhamento dos pacientes que foram estudados.

Contudo, o estudo permitiu uma melhor caracterização dos fatores que contribuem para uma evolução desfavorável dos casos de carcinoma basocelular em topografia periocular, uma vez que foram avaliadas as diferenças entre os dois grupos estudados.

3.4 Aspectos éticos

O trabalho de pesquisa foi conduzido de forma a contemplar as disposições contidas nas resoluções CNS nº 196/1996 sobre a pesquisa envolvendo seres humanos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP com processo HCRP nº 4708/2011 (Anexo IV).

3.5 Avaliação imuno-histoquímica e análise dos resultados

Os cortes foram analisados com microscópio óptico e as células foram consideradas positivas para todos os marcadores na presença de imunoprecipitado castanho em localização citoplasmática ou nuclear, dependendo do marcador avaliado. Foram avaliados 3-5 campos (aumento 200X) e a porcentagem de células marcadas positivamente foi avaliada pela contagem de células positivas por 1000 células tumorais e a imunorreatividade de cada marcador foi classificada como: 1 +, <25% das células tumorais mostram reatividade nuclear, 2 +, 25-50%, 3 +, 51-75%; e 4 +, 76-100% de células marcadas no tumor (De Rosa, et al., 1993).

Os critérios utilizados para esta classificação foram os mesmos preconizados por Jacobs et al. (1982), De Rosa et al. (1992), De Rosa et al. (1993) e por Staibano et al. (2001). As características morfológicas usadas para identificar CBCs agressivos foram:

- 1) ausência da periferia em paliçada das ilhotas tumorais;
- 2) pleomorfismo nuclear;
- 3) altos índices mitóticos;
- 4) estroma fortemente hialinizado e;
- 5) padrão irregular de invasão com formação de cordões alongados de células neoplásicas.

Para os achados morfológicos considerados para os CBCs não-agressivos foram:

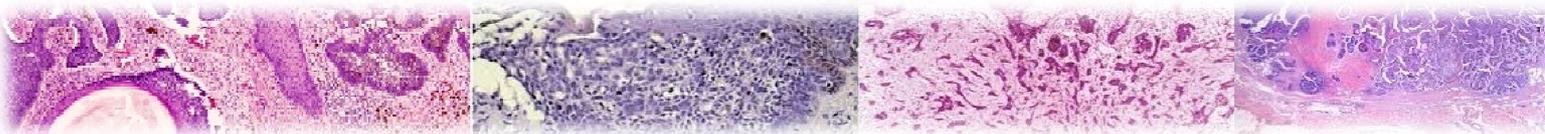
- 1) células neoplásicas uniformes, com núcleos ovais a alongados e pálidos;
- 2) estroma fibroso onde estão homogeneamente dispersas as ilhotas neoplásicas, e
- 3) periferia das ilhotas tumorais caracteristicamente dispostas em paliçada.

3.6 Análise estatística

Para comparar as proporções de casos positivos marcados pelos diferentes marcadores em tumores com invasão neoplásica e sem invasão neoplásica, foi utilizada a estatística de Cochran, que, segundo Siegel e Castellan (2006), substitui com propriedade o teste do qui-quadrado (X^2), no caso de amostras correlacionadas (não independente).

Para a análise da diferença nos marcadores entre os grupos, utilizou-se um nível significativo de ensaios de $p < 0,05$. A análise foi feita utilizando o software SPSS v.10.0 (Ansarin et al., 2006).

4 RESULTADOS



4 RESULTADOS

Dentre os 19 casos de invasão orbitária estudados, submetidos à exenteração da órbita, 12 (63,16%) eram indivíduos masculinos e 07 (36,84%) femininos (Gráfico 1).

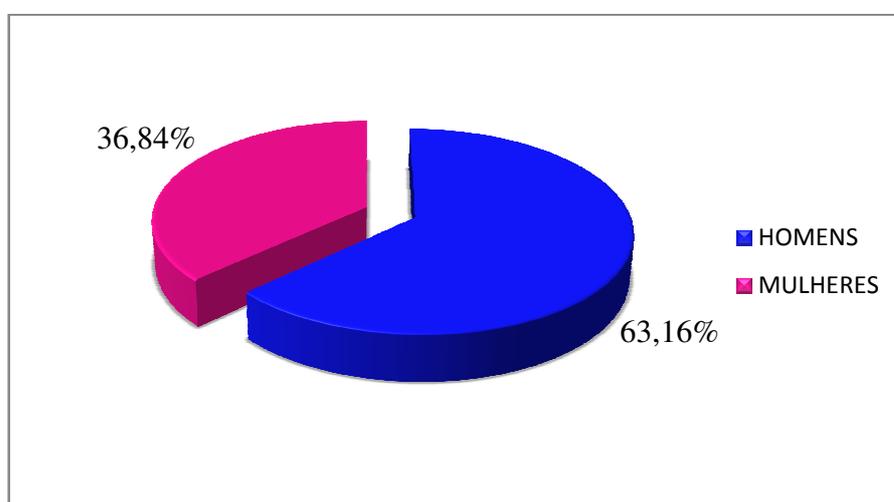


Gráfico 1- Distribuição segundo sexo dos casos (n= 19) com diagnóstico de CBC com invasão orbitária e posterior exenteração orbitária, no HCFMRP-USP, período de janeiro de 1992 a julho de 2012.

A idade média foi de 68 anos, a idade mínima foi de 50 anos e a máxima de 83 anos (Gráfico 2).

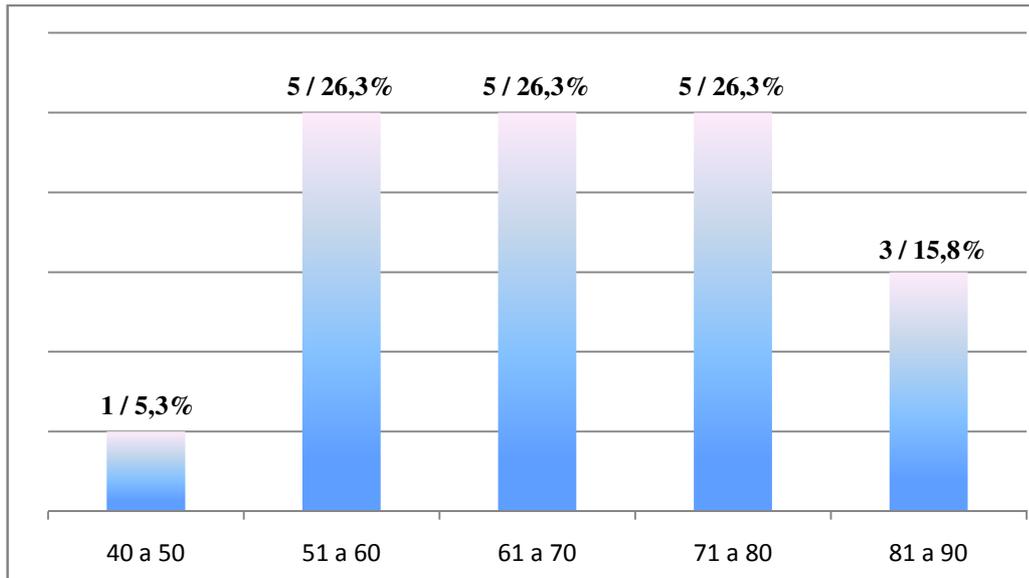


Gráfico 2-Distribuição por idade, dos casos (n= 19) com diagnóstico de CBC com invasão orbitária e posterior exenteração orbitária, no HCFMRP-USP, período de janeiro de 1992 a julho de 2012 [n / %].

Houve predominância da cor branca da pele dos pacientes estudados.

Dentre os subtipos histológicos que invadiram a órbita, prevaleceu o nodular (73,69%), seguido pelo esclerodermiforme (15,78%) e micronodular (10,53%) (Gráfico 3).

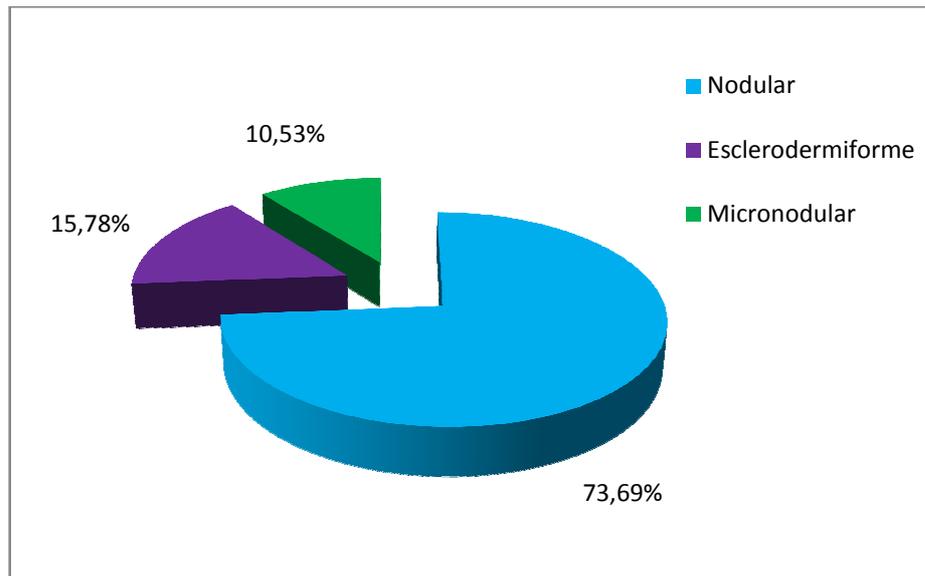


Gráfico 3- Distribuição dos subtipos, dos casos (n= 19) com diagnóstico de CBC com invasão orbitária e posterior exenteração orbitária, no HCFMRP-USP, período de janeiro de 1992 a julho de 2012.

Dos dezenove casos de tumores com invasão orbitária, dois (10,5%) apresentaram infiltração perineural e dezessete (89,5%) não apresentaram (Tabela 4).

Com relação aos casos de tumores com invasão orbitária, dos dezenove casos para a marcação pela proteína bcl-2, doze (63,2%) foram positivos e sete (36,8%) negativos (Figura 3 e Tabela 2). Da marcação pela proteína p53, quatro casos (21,1%) foram positivos e quinze (78,9%) negativos (Figura 4e Tabela 2). Da marcação pela proteína MMP-1, onze casos (57,9%) foram positivos e oito (42,1%) negativos (Figura 5 e Tabela 2). Da marcação pela proteína actina de músculo liso, quatro casos (21,1%) foram positivos e quinze (78,9%) negativos (Figura 6 e Tabela 2).

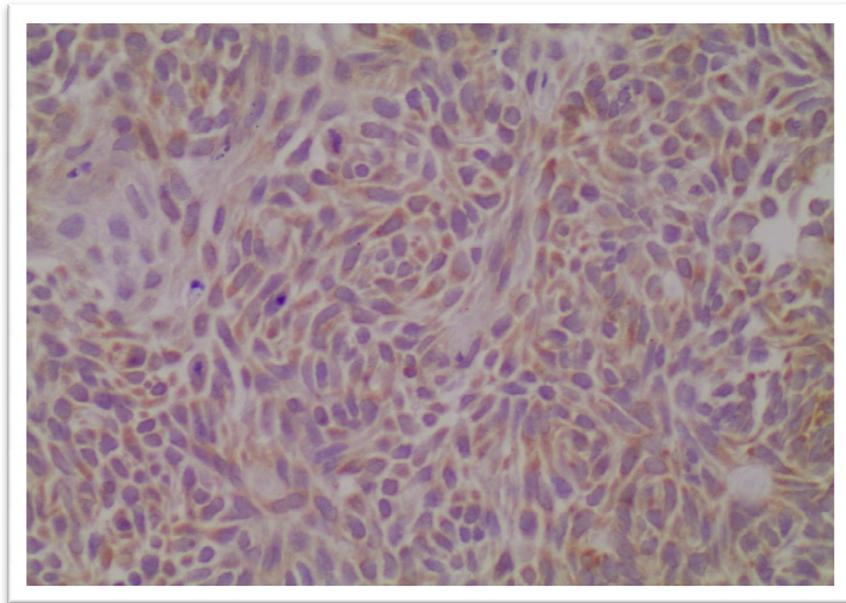


Figura 3 - Marcação com bcl-2

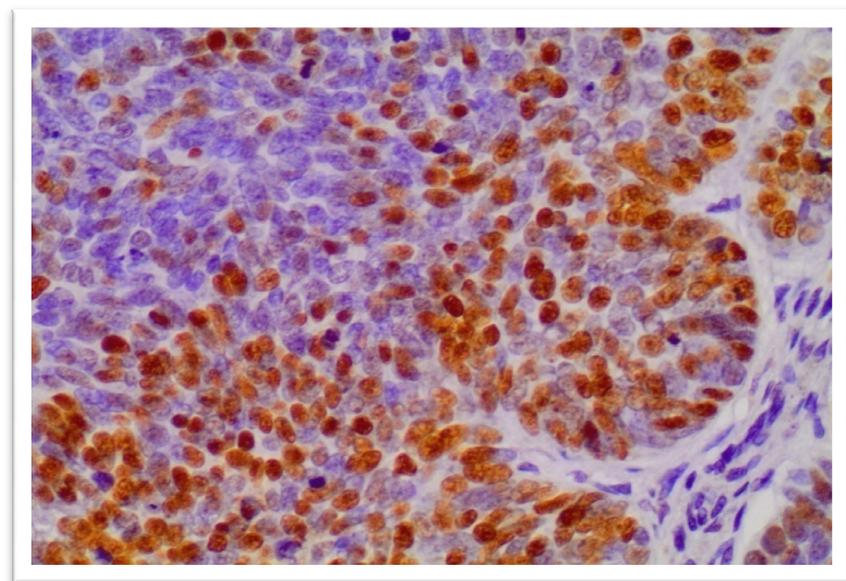


Figura 4 - Marcação com p53

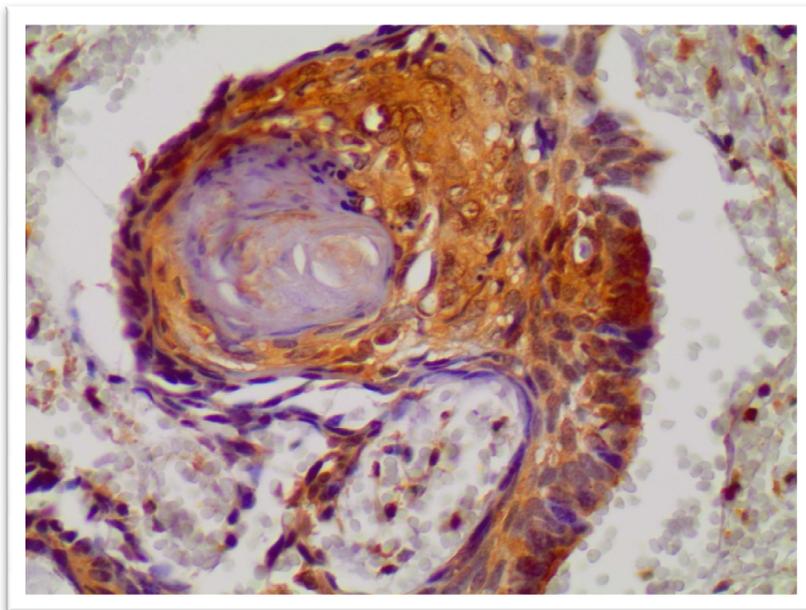


Figura 5 - Marcação com MMP-1

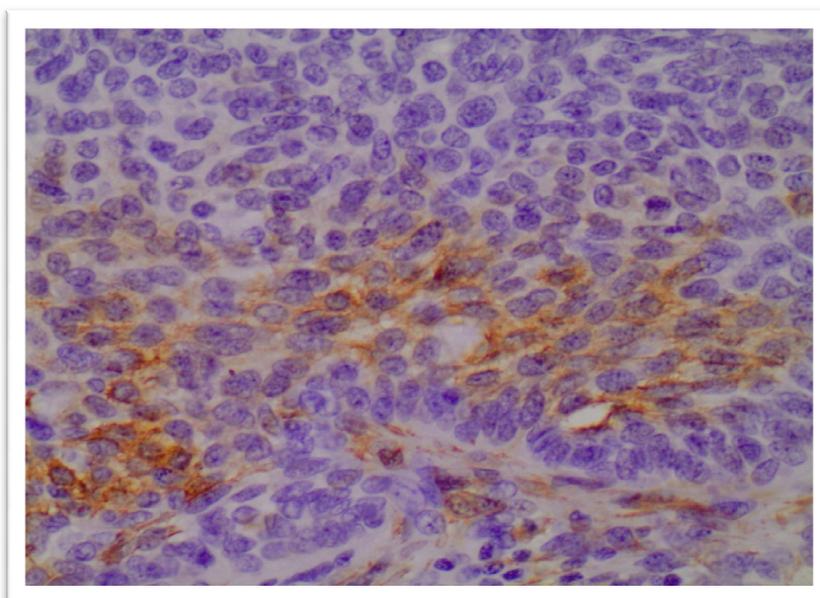


Figura 6 - Marcação focal com actina de músculo liso

Com relação aos casos de tumores sem invasão orbitária, dos trinta e oito casos, vinte e quatro casos (63,16%) foram positivos para bcl-2 e quatorze (36,84%) negativos. Da marcação pela proteína p53, doze casos (31,58%) foram positivos e vinte e seis (68,42%) negativos. Da marcação pela proteína MMP-1, dezoito casos (50,0%) foram positivos e dezoito (50,0%) negativos. Da marcação pela

proteína actina de músculo liso, doze casos (31,58%) foram positivos e vinte e seis (68,42%) negativos (Tabela 3).

Para os casos de tumores com invasão orbitária, a proporção de casos positivos marcados por p53 (0,21) e por actina (0,21) é significativamente menor que a proporção de casos positivos marcados por bcl-2 (0,63) e por MMP-1 (0,58) ($p=0,0331$). Entretanto, a proporção de casos positivos marcados por bcl-2 (0,63) é significativamente maior que a proporção de casos positivos marcados por MMP-1 (0,58) ($p=0,0126$).

Para os casos de tumores sem invasão orbitária, a proporção de casos positivos marcados por p53 (0,31) e por actina (0,31) é significativamente menor que a proporção de casos positivos marcados por bcl-2 (0,63) e por MMP-1 (0,50) ($p=0,0273$). A proporção de casos positivos marcados por MMP-1 (0,50) não é significativamente diferente da proporção de casos positivos marcados por bcl-2 (0,63) ($p=0,059$).

Outro achado importante dos casos de invasão orbitária foi o tempo entre a lesão inicial e a exenteração, que variou entre 2 anos a 12 anos como demonstrado na tabela 4.

Os procedimentos realizados nos pacientes do grupo 1 variaram entre 2 a 18 abordagens, também demonstrados na tabela 4.

O número de lesões variaram entre 1 a 11 conforme a tabela 4.

Tabela 2- Resultados da imunomarcção dos 19 casos de CBC com invasão orbitária

MARCADORES COM INVASÃO ORBITÁRIA	
bcl-2	12 (63,2%)
p53	4 (21,1%)
MMP-1	11 (57,9%)
1A-4	4 (21,1%)

Tabela 2- Resultados da imunomarcção dos 38 casos de CBC sem invasão orbitária

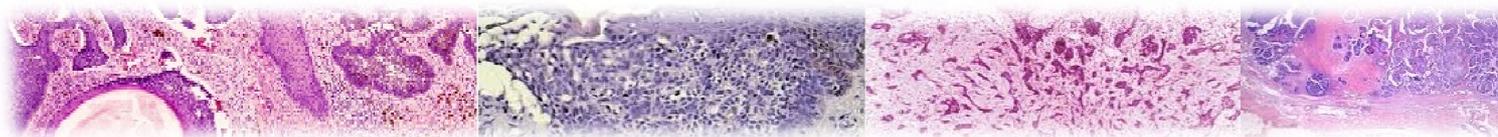
MARCADORES SEM INVASÃO ORBITÁRIA	
bcl-2	24 (63,16%)
p53	12 (31,58%)
MMP-1	19 (50,0%)
1A-4	12 (31,58%)

Tabela 4- Resultados Clínicos dos 19 casos de CBC com invasão orbitária

<i>Paciente</i>	<i>Idade ao Diagnóstico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Raça</i>	<i>Início do sintoma e abordagem</i>	<i>Classificação clínica da lesão</i>	<i>Infiltração Perineural</i>	<i>Nº de Abordagens</i>	<i>Tempo entre a lesão inicial e exenteração</i>	<i>Nº de lesões</i>
1	80 anos	M	Branco	01 ano	CBC fibrosante	*	13	10 anos	11
2	68 anos	F	Branco	05 anos	CBC nodular esclerosante	Sim	03	05 anos	08
3	63 anos	M	Branco	05 anos	CBC adenóide e fibrosante	Não	10	06 anos	06
4	87 anos	F	Branco	02 anos	CBC nodular, micronodular esclerosante	Não	04	02 anos	03
5	50 anos	F	Branco	*	CBC micronodular infiltrativo	Não	04	*	02
6	51 anos	M	Branco	04 meses	CBC sólido e fibrosante	Não	05	03 anos	03
7	83 anos	F	Branco	*	CBC nodular esclerosante	Não	02	*	01
8	67 anos	F	Branco	*	CBC nodular esclerosante	Não	04	02 anos	05
9	72 anos	F	Branco	02 anos	CBC sólido esclerosante	Sim	11	05 anos	08
10	79 anos	M	Branco	04 anos	CBC nodular esclerosante	Não	18	*	03
11	74 anos	M	Branco	Vários anos	CBC nodular esclerosante	Não	08	06 anos	07
12	60 anos	M	Branco	Vários anos	CBC nodular esclerosante	Não	13	*	08
13	57 anos	M	Branco	04 anos	CBC nodular esclerosante	Não	13	04 anos	11
14	63 anos	M	Branco	05 anos	CBC nodular, esclerosante	Não	02	05 anos	03
15	65 anos	F	Branco	14 anos	CBC nodular esclerosante	Não	13	*	07
16	84 anos	M	Branco	08 anos	CBC nodular esclerosante	Não	04	02 anos	01
17	52 anos	M	Branco	03 anos	CBC sólido esclerosante	Não	02	08 anos	03
18	43 anos	M	Branco	04 anos	CBC nodular esclerosante	Não	06	02 anos	03
19	60 anos	M	Branco	*	CBC nodular esclerosante	Não	13	12 anos	02

* Informação não disponível.

5 DISCUSSÃO



5 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura científica, a maioria dos CBCs ocorre em homens. Essa maior incidência em homens é provavelmente devido ao aumento ocupacional e/ou recreativo à exposição solar, o que condiz com nossos dados, já que nosso estudodemonstra maior prevalência em homens (Dreier et al., 2014; Murray et al., 2015), resultado expresso no gráfico 1 e descrito na tabela 2.

Segundo Haas et al., (1996), aproximadamente 95% dos CBCs ocorrem entre 40 e 69 anos, com uma média etária de 60 anos. Em nosso estudo, a idade média dos pacientes com invasão orbitaria por CBC foi de 68 anos, média que corrobora com Haas et al., (1996) e Shanfer et al., (2014) onde a média etária para casos de CBC é acima de 50 anos.

Em nosso trabalho também verificamos a predominância da cor da pele branca e a prevalência do tipo histológico nodular, resultadoexpresso na tabela 2 e coerente com o obtido por Murray (2007) que também descreve maior prevalência desta neoplasia em caucasianos.

Alguns autores acreditam que a proteína bcl-2, expressa nas células basais do epitélio de revestimento, proteja estas células da apoptose, desempenhando papel importante na proliferação tecidual e regeneração das camadas mais altas do epitélio estratificado. A expressão da proteína bcl-2 decresce concomitantemente com a diferenciação final da célula, facilitando o processo apoptótico das células superficiais, mais expostas a fatores potencialmente carcinogênicos (Saegusa et al., 1995).

Em relação aos tumores que invadiram a órbita, a proporção de positividade de marcação para bcl-2 é maior que a positividade para os marcadores MMP-1, p53 e actina de músculo liso.

Embora, na maioria dos estudos, a expressão do bcl-2 esteja relacionada com a gravidade do tumor, um trabalho de revisão concluiu que esse “gene da sobrevivência da apoptose” (bcl-2) está aumentado nos CBCs nodular e superficial (Lear, 2007).

A relação existente entre a positividade para a proteína bcl-2 e o grau de agressividade do CBC pode ser considerada contraditória. Autores como Staibano et al. (2001), Crowson et al. (1996), Ramdial et al. (2000) mostraram maiores índices de proteínas bcl-2 em CBCs considerados indolentes. Por outro lado, Verhaegh et al. (1995) não encontraram relação entre a expressão desta proteína e o comportamento agressivo. Muitos estudos detectaram a super-expressão da proteína bcl-2 em uma grande variedade de cânceres. Entretanto, esta relação entre o comportamento biológico dos tumores estudados e o grau de expressão protéica ainda permanece inconclusivo, sendo necessárias maiores correlações com outros genes e utilização de novas técnicas moleculares (Jäckel et al., 1999; Lauwers et al., 1995; Leahy et al., 1999; Lu et al., 1997).

O p53 está frequentemente alterado nos tumores humanos, incluindo o câncer de pele, em que tais mutações foram mostradas como resultado da exposição solar. Alterações do p53 são encontradas em 50% dos casos de CBC, porém é difícil discernir se esse defeito do “gene supressor de tumor mais conhecido” (p53) é a causa do desenvolvimento do CBC ou se é meramente um marcador de danos causados pela luz ultravioleta (Staibano et al., 2001). Tilli et al. (2015) concluíram que a síntese ou a estabilização do p53 é essencial para induzir a apoptose no CBC.

Cribier B. et al. (2001) mostraram que a MMP-1 é expressa intensamente nos subtipos agressivos de CBC. Em nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas de expressão de MMP-1 entre os casos com invasão orbitária e os casos controles.

Nosso maior interesse foi o de observar, através de estudo imuno-histoquímico, se aqueles CBCs que invadiram a órbita e levaram à exenteração orbitária, expressam com maior frequência alguns marcadores, tais como, p53, bcl-2 que possui relevância prognóstica na evolução do carcinoma basocelular, actina de músculo liso, envolvida no processo de migração celular, essencial para a infiltração neoplásica em subtipos de pior prognóstico e MMP-1 envolvida no desencadeamento de eventos ligados à angiogênese e progressão de neoplasias.

Não foi possível demonstrar diferenças de expressão dos citados marcadores entre os casos com invasão orbitária e os casos-controles.

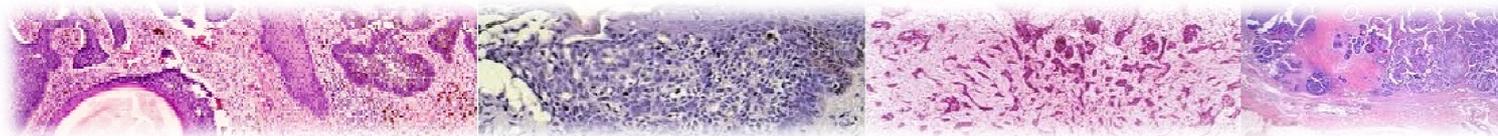
De acordo com Codazzi et al. (2014), quando as margens cirúrgicas são negativas, o CBC apresenta baixa recorrência, variando entre 1 a 14%. Gulleth et al. (2010) também verificaram taxa de 14% de recorrência em casos de margens cirúrgicas negativas.

Por se tratar de estudo retrospectivo, a avaliação das margens, nos casos estudados, foi realizada por diversos patologistas, o que tornou difícil a inclusão deste dado, de forma segura, no presente estudo.

A presença de invasão perineural pôde ser observada em 10,5% dos pacientes com invasão orbitária. Sabe-se que a ocorrência de invasão perineural não é um evento frequente, ocorrendo em menos de 1% dos casos. Segundo alguns autores (Niazi ZB; Lamberty, 1993), a ocorrência de invasão perineural relaciona-se à maior comorbidade e risco de metástases.

Por fim, salientamos a necessidade da busca constante de novos parâmetros clínico-patológicos para identificação de tumores mais agressivos, o que resultaria em ganho de qualidade de vida para o paciente, além de diminuição de custos em saúde, pois tratamentos mais resolutivos, baseados em diagnósticos mais precoces, diminuiriam as recidivas tumorais e evitariam a necessidade de um procedimento agressivo ao paciente, como a exenteração orbitária.

6 CONCLUSÕES

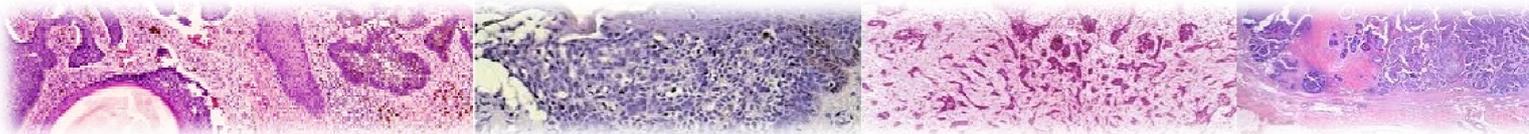


6 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu a elaboração das seguintes conclusões:

- Verificou-se que os homens são frequentemente mais afetados que as mulheres e que a invasão orbitária ocorre principalmente em homens de cor branca, com idade entre 43 e 84 anos.
- Os pacientes que apresentaram invasão orbitária são portadores de múltiplas lesões de CBCs na área periocular e a maioria deles foi submetida a múltiplos procedimentos.
- O tipos histológicos mais freqüentes nos casos de invasão orbitária foram o nodular (63,16%)e o esclerodermiforme (15,78%).
- Tanto os casos de invasão orbitária quanto nos controles, os tumores expressam mais frequentemente os marcadores bcl-2 e MMP-1.
- O presente trabalho não mostra diferenças significativas de expressão dos marcadores p53, bcl-2, actina de músculo liso, e MMp-1, entre os casos com invasão orbitária e os controles.

7 REFERÊNCIAS



7 REFERÊNCIAS

ANSARIN, H.; DALIRI, M.; SOLTANI-ARABSHSAHI, R. Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Experiental Dermatology*, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 543-547, 2006.

ANTONSON, B.; MARTINOU, J. C. The bcl-2 protein family. *Exp Cell Res*, New York, v. 256, n. 1, p. 50-57, Apr. 2000.

AUEPEMKIATE S, BOONYAPHIPHAT P, THONGSUKSAI P. p53 expression related to the aggressive infiltrative histopathological feature of basal cell carcinoma. *Histopathology*. 2002;40:568–573.

BARBARESCHI M, GIRLANDO S, CRISTOFOLINI P, *et al*. p53 protein expression in basal cell carcinoma. *Histopathology* 1992; 21:579-81.

BARBAUD A, SIMON M, PARACHE RM, SERRE G. Immunohistochemical characterization of the differentiation state of basal cell carcinomas with special interest for infiltrating relapsing tumors. *Eur J Dermatol* 1998; 8: 320-4.

BARRETT T.L, SMITH KJ, HODGE JJ, *et al*. Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, and Ki-67 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37:430-7.

BOONCHAI W, WALSH M, CUMMINGS M, CHENEVIX-TRENCH G. Expression of p53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2000; 136: 195-8.

BOULINGUEZ, S.; GRISON-TABONE, C.; LAMANT, L.; VALMARY, S.; VIRABEN, R.; BONNETBLANC, J.M.; DANE, C.B. Histological evolution of recurrent basal cell carcinoma and therapeutic implications for incompletely excised lesions. *British Journal of Dermatology*, Londres, v. 151, n. 3, p. 623-626, 2004.

BRADA, M. Bcl-2 gene: current relevance to clinical oncology. *Eur J Cancer*, Oxford, v. 28, n. 1, p. 270-272, Jan. 1992.

CARR RA TAIJBEE SM, SANDERS DAS. Basoid skin tumours: Basal cell carcinoma. *Curr Diagn Pathol*. 2007; 13:252-72.

CARTER DM, LIN AN. Basal cell carcinoma. In: Fitzpatrick TM, Eisen AZ, Wolff K, et al (eds). *Dermatology in General Medicine*, 4th edn. McGraw-Hill: New York, 1993, p 840–847.

CAZAL C., ELY M. R., SOBRAL A. P. V., PADILHA W. W. N. Aumento da expressão bcl-2 em carcinoma basocelular agressivo da região de cabeça e pescoço. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, 2006; 6(3): 267-272.

CODAZZI, D; V. D. V. J., CARMINATI M, BRUSCHI S, BOCCHIOTTI MA, DI SERIO C, ET AL. Positive compared with negative 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;48:30-43.

COHEN, P.R.; SCHULZE, K.E.; NELSON, B.R. Basal Cell Carcinoma with Mixed Histology: a Possible Pathogenesis for Recurrent Skin Cancer. *Dermatologic Surgery*, Edimburgo, v. 32, n. 4, p 542-551, 2006.

CRIBIER B., NOACCO G., PELTRE B., GROSSHANS E. Expression of stromelysin 3 in basal cell carcinomas, *Eur J Dermatol*, 2001,11(6):530–533.

CROWSON, N. A. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Modern Pathology* (2006) 19, S127–S147.

CROWSON, A. N.; MAGRO, C. M.; KADIN, M. E.; STRANC, M. Differential expression of the bcl-2 oncogene in human basalcell carcinoma. *Hum Pathol*, Philadelphia, v. 27, n. 4, p. 355-359, Apr. 1996.

DE ROSA G, STAIBANO S, BARRA E, *et al*. p53 Protein in aggressive and non-aggressive basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 429-34.

DE ROSA, G.; STAIBANO, S.; BARRA, E.; ZEPPA, P.; SALVATORE, G.; VETRANI, A. et al. Nucleolar Organizer Regions in aggressive and non-aggressive basal cell carcinoma of the skin. *Cancer*, Philadelphia, v. 69, n. 1, v. 123-126 Jan. 1992.

DE ROSA, G.; VETRANI, A.; ZEPPA, P.; ZABATTA, A.; BARRA, E.; GENTILE, R. et al. Comparative morphometric analysis of aggressive and ordinary basal cell carcinoma of the skin. *Cancer*, Philadelphia, v. 65, n. 3, p. 544-549, Feb. 1990.

DIXON AY, LEE SH, MCGREGOR DH. Factors predictive of recurrence of basal cell carcinomas. *Am J Dermatopathol* 1989; 11:222-32.

DREIER J, CHENG PF, BOGDAN ALLEMAN I, GUGGER A, HAFNER J, TSCHOOP A, et al. Basal cell carcinomas in a tertiary referral centre: a systematic analysis. *Br J Dermatol*. 2014;171:1066-72.

GOLDBERG LH. Basal cell carcinoma. *Lancet* 1996;347:663–667. Head and neck. *Anticancer Res*, Athens, v. 21, n. 6a, p. 3757-3764, Nov. 2001.

GOLDSTEIN A.M, BALE SJ, PECK GL, et al. Sun exposure and basal cell carcinoma in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Am Acad Dermatol* 1993;29: 34–41. 8.

GULLETH Y, GODBERG 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.

HEALY E, ANGUS B, LAWRENCE CM, REES JL. Prognostic value of Ki67 antigen expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 1995; 133: 737-41.

HENDRIX JD JR, PARLETTE HL. Micronodular basal cell carcinoma. A deceptive histologic subtype with frequent clinically undected tumour extension. *Arch Dermatol*.1996;132:295-8.

JÄCKEL, M. C.; DORUDIAN, M. A.; MARX, D.; BRINCK, U.; SCHAUER, A.; STEINER, W. Spontaneous apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma is independent of bcl-2 and bax protein expression. *Cancer*, Philadelphia, v. 85, n. 3, p.591-599, Feb. 1999.

JOHNSON TM, TSCHEN J, HO C, et al. Unusual basal cell carcinomas. *Cutis* 1994;54:85–92.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 9 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999.

KERKELÄ E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix Metalloproteinases in Tumor Progression: Focus on Basal and Squamous Cell Skin Cancer. *Experimental Dermatology*, Copenhagen, v. 12, n. 3, p. 623-626, 2003.

KIRKHAM N. Tumors and cysts of the epidermis. In: Elder DE, Elenitsas R, Murphy GF, et al., eds. *Lever's Histopathology of the Skin*. 9th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2005:805–866.

KOSSARD, S.; EPSTEIN, E. H.; CERIO, R.; YU, L. L.; WEEDON, D. Basal Cell Carcinoma. In: *World Health Organization Classification of Tumours: Skin Tumours*. Lyon: IARC Press, 2006. p. 13-20.

LAUWERS, G. Y.; SCOTT, G. V.; KARPEH, M. S. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer*, Philadelphia, v. 75, n. 9, p2209-2213, May, 1995.

LEAHY, D. T.; MULCAHY, H. E.; O'DONOGHUE, D. P.; PARFREY, N. A. Bcl-2 protein expression is associated with better prognosis in colorectal cancer. *Histopathology*, Oxford, v. 35, n. 4, p. 360-367, Oct. 1999.

LEAR W, DAHLKE E, MURRAY CA. Basal Cell Carcinoma: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Associated Risk Factors. *J Cut Med Surg*. 2007;11:19-30.

LEIBOVITCH, I.; MCNAB, A.; SULLIVAN, T.; DAVIS, G; SELVA, D. Orbital Invasion by Periocular Basal Cell Carcinoma. *Ophthalmology*, Rochester, v. 112, n. 4, p. 717-723, 2005.

LU, Q. L.; LANIADO, M.; STAMP, G. W.; LALANI, E. N. Expression of bcl-2 in bladder neoplasms in a cell lineage associated and p53-independent event. *Mol Pathol*, London, v. 50, n. 1, p. 28-33, Feb. 1997.

MURRAY, T. S. NASSAB, R.S. *Orbital exenteration for advanced periorbital skin cancers: 20 years experience*. *JPlast Reconstr Aesthet Surg* 2007;60:1103-9.

NAKAYAMA, M.; TABUCHI K.; NAKAMURA, Y.; HARA A. Basal Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Skin Cancer*. Volume 2011, Article ID 496910, 9 pages doi:10.1155/2011/496910.

NIAZI ZBM, LAMBERTY BGH. Perineural infiltration in basal cell carcinomas. *Br J Plast Surg* 1993;6:156–157.

ORAM Y, ORENKO I, GRIEGO RD, et al. Histologic patterns of basal cell carcinoma based upon patient immunostatus. *Dermatol Surg* 1995;21:611–614.

PADGETT JK, HENDRIX JD JR. Cutaneous malignancies and their management. *tolaryngol Clin North Am* 2001;34:523–553.

PANDY, S.; SHARMA, V.; TITIYAL, G.S.; SATYAWALI, V. Sequential occurrence of basal cell carcinoma in symmetrically identical positions of both lower eyelids: A rare finding of a common skin cancer. *Oman Journal of Ophthalmology*, 2010; 3(3): 145-147.

PANUNCIO A, VIGNALE R, LOPEZ G. Immunohistochemical study of nerve fibres in basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol* 2003; 13: 250-3.

PILLONI, L.; BIANCO, P.; MANIELI, C.; SENES, G.; CONI, P.; ATZORI, L.; ASTE, N.; FAA, G. Immunoreactivity for alpha-smooth muscle actin characterizes a potentially aggressive subgroup of little basal cell carcinomas. *European Journal of Histochemistry*, Pavia, v. 53, n. 2, p. 113-116, 2009.

RAMDIAL, P. K.; MADAREE, A.; REDDY, R.; CHETTY, R. Bcl-2 protein expression in aggressive and non-aggressive basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*, Copenhagen, v. 27, n. 6, p. 283-291, Jul. 2000.

RAO BK, FREEMAN RG, POULOS EG, et al. The relationship between basal cell pithelioma and seborrheic keratosis. *J Dermatol Surg Oncol* 1994;20:761–764.

RIML S, LARCHER L, KOMPATSCHER P. Complete excision of nonmelanotic skin cancer: a matter of surgical experience. *Ann Plast Surg*.2013;70:66-9.

RIPPEY JJ. Why classify basal cell carcinomas? *Histopathology* 1998; 32: 393-8.

ROHRBACH, J.M.; STIEMER, R.; MAYER, A; RIEDINGER, C.; DUIJVESTINJN, A; ZIERHUT, M. Immunology and Growth Characteristics of Ocular Basal Cell Carcinoma. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, Munique, v. 239, n. 1, p. 35-40, 2001.

SAEGUSA, M.; TAKANO, Y.; HASHIMURA, M.; SHOJI, Y.; OKAYASU, I. The possible role of bcl-2 expression in the progression of tumors of the uterine cervix. *Cancer*, Philadelphia, v. 76, n. 11, v. 2297-2303, Dec. 1995.

SAHL WJ. Basal cell carcinoma: Influence of tumor size on mortality and morbidity. *Int J Dermatol* 1995;34: 319–321.

SANTA CRUZ, D. J. Tumors of the Skin. In: *Diagnostic Histopathology of Tumors*. Boston: Elsevier, 2008. p. 1423-1527.

SHANTI PANDEY, VIMLESH SHARMA, G. S. TITIYAL, VIVEKANAND SATYAWALI. Sequential occurrence of basal cell carcinoma in symmetrically identical positions of both lower eyelids: a rare finding of a common skin cancer. *Oman Journal of Ophthalmology*, 2010; 3 (3):145-147.

SHEA CR, MCNUTT NS, VOLKENANDT M, *et al.* Overexpression of p53 protein in basal cell carcinoma of human skin. *Am J Pathol* 1992; 141: 25-9.

SHIN DM, LEE JS, LIPPMAN SM, *et al.* p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 519-29.

SHINDER, R.; AL-ZUBIDI, N.; ESMAELI, B. Survey of Orbital Tumors at a Comprehensive Cancer Center in the United States. *Head and Neck*, Nova York, 2007.

SIEGEL, S., CASTELLAN JR., N. J. *Estatística não paramétrica para ciências do comportamento*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

SITUM M, BULJAN M, BULAT V, LUGOVIC MIHIC L, BOLANCA Z, SIMIC D. The role of UV radiation in the development of basal cell carcinoma. *Coll Antropol*. 2008; 32:167-70.

SOUTO LR, REHDER J, VASSALLO J, CINTRA ML, KRAEMER MH, PUZZI MB. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *São Paulo Med J*. 2006 Mar 2;124(2):71-6.

SOYSAL, H.G.; SOYSAL, E.; MARKOÇ, F.; ARDIÇ, F. Basal Cell Carcinoma of the Eyelids and Periorbital Region In a Turkish Population. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, Nova York, v. 24, n. 3, p. 201-206, 2008.

STAIBANO S, LO MUZIO L, PANNONE G, *et al.* Interaction between bcl-2 and P53 in neoplastic progression of basal cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 2001; 21: 3757-64.

STETLER STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S AND LIOTTA LA (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541–573

TILLI CMLJ, VAN STEENSEL MAM, KREKELS GAM, NEUMANN HAM, RAMAEKERS FCS. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2005;152:1108-24.

VERHAEGH, M. E.; SANDERS, C. J.; ARENDS, J. W.; NEUMANN, H. A. Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2 in non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol*, London, v. 132, n. 5, p. 740-744, May, 1995.

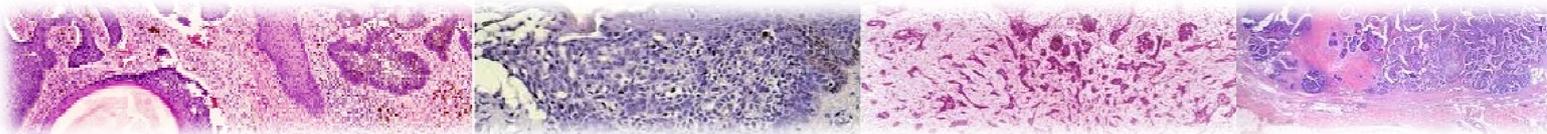
WALLING, H.W.; FOSKI, S. W.; GERAMINEJAD, P.A.; WHITAKESN, D. C.; ARPEY, C. J. Aggressive Basal Cell Carcinoma: Presentation, Pathogenesis and Management. *Cancer and Metastasis Review*, Amsterdã, v. 23, n. 3-4, p. 389-402, 2004.

Wordpress. Atlas de histologia: [Acesso: 20 Ago. 2015] Disponível em: <https://atlasdehistologia.wordpress.com>.

WYATT, A. J.; BUSAM, K. J. Tumors of the Epidermis. In: *Dermatopathology*. Nova York: Elsevier, 2010. p. 333-381.

ZAGRODNIK, B. KEMPF, W. SEIFERT, B. MÜLLER. BURG, G. UROSEVIC, M. DUMMER, R., B. Superficial Radiotherapy for Patients with Basal Cell Carcinoma *Recurrence Rates, Histologic Subtypes, and Expression of p53 and Bcl-2*. American Cancer Society, 2003.

8 ANEXOS



ANEXO I	
COLETA DE DADOS CLÍNICOS – CASOS	
<i>Dados Epidemiológicos</i>	<i>Registro:</i>
Data de nascto.:Idade ao diagnóstico:	
Sexo:	
Raça: () Branco() Pardo () Preto	
Procedência:	
Comorbidades:	
<i>Dados Clínicos</i>	
Nº de lesões:	
Tamanho e localização da lesão:	
Tempo entre início do sintoma e primeira abordagem:	
Classificação clínica da lesão:	
Número de abordagens:	
Tipo de abordagem e lesão(ões) abordada(s):	
<i>Dados Histopatológicos</i>	
Distância da lesão em relação às margens:	
Tamanho microscópico da lesão:	
Subtipo histopatológico:	
Subtipo histopatológico secundário (se houver):	
Infiltração linfocitária:	
Infiltração perineural de lesão:	
Ulceração de lesão:	
Invasão Vascular:	Recidiva:
Lesão submetida a exenteração:	
Local de acometimento ocular:	
Tipo histológico:	
Tempo entre lesão inicial e exenteração:	
Período de acompanhamento:	
<i>Imuno-histoquímica</i>	
p53:	
bcl-2:	
1A4:	
MMP-1:	

ANEXO II	
COLETA DE DADOS CLÍNICOS – CASOS	
Dados Epidemiológicos	Registro:
Data de nascto.:Idade ao diagnóstico:	
Sexo:	
Raça: () Branco() Pardo () Preto	
Procedência:	
Comorbidades:	
Dados Clínicos	
Nº de lesões:	
Tamanho e localização da lesão:	
Tempo entre início do sintoma e primeira abordagem:	
Classificação clínica da lesão:	
Número de abordagens:	
Tipo de abordagem e lesão(ões) abordada(s):	
Dados Histopatológicos	
Distância da lesão em relação às margens:	
Tamanho microscópico da lesão:	
Subtipo histopatológico:	
Subtipo histopatológico secundário (se houver):	
Infiltração linfocitária:	
Infiltração perineural de lesão:	
Ulceração de lesão:	
Invasão Vascular:	Recidiva:
Lesão submetida a exenteração:	
Local de acometimento ocular:	
Tipo histológico:	
Tempo entre lesão inicial e exenteração:	
Período de acompanhamento:	
Imuno-histoquímica	
p53:	
bcl-2:	
1A4:	
MMP-1:	

ANEXO III

Para as reações de imuno-histoquímica foram utilizados cortes histológicos de 3µm de espessura depositados em lâminas previamente silanizadas com organossilano 4% em acetona (3-aminopropil trietoxissilano-SIGMA, St Louis, USA), desparafinadas e reidratadas. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram condicionadas em tampão citrato 10mmol/l, pH 6.0, expostas à panela a vapor por 40 minutos, resfriadas em temperatura ambiente e lavadas em tampão fosfato (PBS).

Para a detecção do p53, bcl-2, 1A4 e MMP-1, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% e PBS por 10 minutos, bloqueio de antígenos com BSA (phosphate buffered saline pH 7,4; Sigma Chemical CO P.O. 14508, St. Louis, MO 63178, USA) por 60 minutos.

Os anticorpos primários foram incubados em câmara úmida na geladeira *overnight*.

Tabela 1 - Anticorpos e reagentes

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Clone</i>	<i>Espécie</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Reagente de marcação</i>
p53	M7001	<i>Mouse</i>	DAKO	1:800	DAB
bcl-2	124	<i>Mouse</i>	DAKO	1:100	DAB
Actina de Músculo liso	1A4	<i>Mouse</i>	DAKO	1:600	DAB
MMP-1	MO887	<i>Rabbit</i>	ABBIOTEC	1:150	DAB

A seguir foram realizadas três lavagens sendo duas com PBS e uma com TBS (10nM phosphate buffered saline pH 7,4, 0,05%, Tween 20); aplicação do anticorpo secundário da Invitrogen (Invitrogen Corporation, 542 Flynn Road, Camarillo, CA 93012, USA) por 30 minutos. Os cortes histológicos foram incubados pelo HRP polímero conjugado *Ready to Use* da Invitrogen por 30 minutos. Desenvolvimento da marcação imuno-histoquímica foi realizado com 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DBA) (Sigma-Aldrich, GmbH, P.O. 1120, 89552 Steinheim, Germany) diluído em tampão PBS e peróxido hidrogênio 0.036% com

tempo de marcação variando de 10 a 5 minutos, contra-corados com Hematoxilina de Harris; desidratados e montados com Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Os controles positivos utilizados foram

Os controles negativos foram preparados por omissão dos anticorpos primários e secundários.

Os controles positivos e negativos reagiram como esperado, validando os resultados do trabalho. Este experimento foi realizado em triplicata e os casos que não tiveram resultados coincidentes foram excluídos.

ANEXO IV



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

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 25 de maio de 2011

Ofício nº 1831/2011
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“INVASÃO ORBITÁRIA POR CARCINOMA BASOCELULAR: EPIDEMIOLOGIA, FATORES CLÍNICOS, HISTOPATOLOGIA E PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DOS CASOS SUBMETIDOS A EXENTERAÇÃO EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 324ª Reunião Ordinária realizada em 23/05/2011 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 4708/2011.

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

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

Atenciosamente.


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

Ilustríssimos Senhores

ANDRÉ COSTA TELXEIRA

PROF. DR. FERNANDO CHAHUD (Orientador)

Serviço de Patologia do HCFMRP-USP