Emerson Henrique Padoveze

**Estudo do macrófago no carcinoma basocelular sólido
recidivado após Cirurgia Micrográfica de Mohs**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Walter Belda Junior

**São Paulo
2015**

Emerson Henrique Padoveze

**Estudo do macrófago no carcinoma basocelular sólido
recidivado após Cirurgia Micrográfica de Mohs**

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Walter Belda Junior

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de
São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Padoveze, Emerson Henrique

Estudo do macrófago no carcinoma basocelular sólido recidivado após exérese
pela Cirurgia Micrográfica de Mohs / Emerson Henrique Padoveze. – São Paulo,
2015.

Dissertação (doutorado) — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Walter Belda Junior.

Descritores: 1. Carcinoma basocelular 2. Cirurgia de Mohs 3. Recidiva local de
neoplasia 4. Macrófago

Dedico esta dissertação

*À minha mãe Maria Antonieta e
ao meu falecido pai Alcides, meus pilares,
pelo amor, pelos valores e pelo incentivo...*

*À minha esposa e eterna companheira Suelen,
por estar sempre ao meu lado...*

*Ao meu irmão Marcos e minha irmã Cláudia,
pela eterna convivência e cumplicidade...*

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Walter Belda Junior, mestre e amigo, exemplo de orientador e profissional, agradeço pela oportunidade e pelo aprendizado.

Prof. Dr. Nilton di Chiacchio, pela sincera amizade e incentivo profissional. Agradeço pela oportunidade de trabalhar ao seu lado. Serei eternamente grato.

Prof. Dra. Mirian Sotto, pela ideia principal do trabalho e auxílio nas atividades no Laboratório de Dermatopatologia.

Dra. Selma S. Cernea, pela minha formação como Cirurgião Micrográfico no Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo (HSPM) e pela oportunidade de utilização dos seus casos cirúrgicos, indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Nilton Gioia di Chiacchio e Diego Leonardo Bet, pela amizade e prazer de tê-los como colegas de trabalho.

Aos colegas de trabalho da Clínica de Dermatologia do HSPM, Walter, Celso, Ada, Letícia, Patrícia, Elisa, Ana Lúcia, Janete, Denise, Teresa, Vitória, Denise Vieira e Primavera.

Aos residentes do HSPM, pelo incentivo e estímulo pelo estudo constante.

À bióloga Naiura Vieira Pereira, pelo auxílio na realização das reações de imunoistoquímica.

Ao Wellington, do Laboratório do Instituto Central, pela gentileza e paciência, no auxílio da contagem das células e fotografia das lâminas.

Ao professor Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelas valiosas contribuições metodológicas para a contagem das células realizadas neste trabalho.

Aos meus sogros Ailton e Célia, pelo carinho e auxílio sempre presentes.

Às minhas cunhadas Jessica e Rebeca e ao meu cunhado Ederson, pelo prazer de tê-los na família.

Aos meus sobrinhos Eduardo e Artur, por trazerem alegria à nossa família.

Ao FUNADERSP, pela viabilização desse projeto.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Primário	15
2.2 Objetivo Secundário	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Carcinoma Basocelular.....	16
3.2 Cirurgia Micrográfica de Mohs	23
3.3 Macrófago.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Desenho do Estudo	35
4.2 Casuística	35
4.3 Procedimento.....	38
4.4 Protocolo de Realização da Técnica de Imunoistoquímica	39
4.5 Análise Semiquantitativa dos Macrófagos M1 e M2.....	41
4.6 Análise Estatística	42
5 RESULTADOS	43
5.1 Análise Descritiva / Caracterização das Amostras	43
5.2 Comparações entre os Grupos por Tipo de Célula (M1 ou M2) e no Geral	45
5.3 Comparações entre os Grupos para a Relação das Células (M1 ou M2) em Comparação ao Total.....	47
5.4 Comparação entre o Tamanho dos Tumores.....	49
5.5 Comparação entre o Tempo de Aparecimento dos Tumores.....	51
6 DISCUSSÃO	53
6.1 Aspectos Gerais das Recidivas	53
6.2 Análise da prevalência do macrófago M2	57
6.3 Comparação entre o tamanho e o tempo de evolução dos tumores ...	59

7 CONCLUSÃO	61
8 REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CBC	Carcinoma basocelular
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Molécula de superfície)
CEC	Carcinoma espinocelular
CMM	Cirurgia micrográfica de Mohs
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
et al.	e outros
Hh	<i>Hedgehog</i>
HSPM	Hospital do Servidor Público Municipal de São Paulo
IL	Interleucina
IFN-γ	<i>Interferon-gama</i>
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
MAT	Macrófago associado ao tumor
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
NO	Óxido nítrico
ROI	Intermediadores da reação do oxigênio
SMO	Smoothened
Th	<i>T helper</i> / T auxiliar
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
UVB	Ultravioleta B

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Fatores de risco para recidiva do CBC.....	22
Tabela 2 –	Casos recidivados de CBC após exérese pela CMM no HSPM entre 1996 e 2007.....	35
Tabela 3 –	Casos de CBC sólidos recidivados incluídos no Grupo Estudo.....	37
Tabela 4 –	Casos de CBC sólido não recidivados incluídos no Grupo Controle.....	37
Tabela 5 –	Anticorpos utilizados.....	39
Tabela 6 –	Estatísticas descritivas da idade dos pacientes.....	43
Tabela 7 –	Frequências e porcentagens para o perfil dos sujeitos.....	44
Tabela 8 –	Frequências e porcentagens para a localização dos tumores.....	44
Tabela 9 –	Estatísticas descritivas e resultados da comparação entre os grupos.....	45
Tabela 10–	Estatísticas descritivas e resultados da comparação entre os grupos.....	47
Tabela 11–	Coeficientes de correlação de Pearson (r) e p-valores....	49
Tabela 12–	Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre os tamanhos por variável.....	50
Tabela 13–	Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre o tempo de aparecimento do tumor por variável.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Áreas em cinza correspondem ao “H” da face, locais com alto risco de recidiva para os carcinomas basocelulares.....	21
Figura 2 –	Esquema demonstrando a diferenciação dos monócitos de acordo com a citocina estimulante. Na presença de interferon- γ (IFN γ) e produtos bacterianos, os monócitos são diferenciados em macrófago M1. Na presença de fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), interleucina 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10, IL-13), corticosteróides e vitamina D3, os monócitos são diferenciados em macrófago M2. Os subtipos M1 e M2 diferem-se com relação ao fenótipo e a função. Células M1 têm elevado poder anti-bacteriano, imuno-estimulatório e de promover citotoxicidade tumoral. Células M2 têm elevada capacidade de remover detritos, estimular a neoangiogênese e, promover a remodelação e a reparação tecidual.	33
Figura 3 –	Resultados observados para a porcentagem de células por grupo.....	45
Figura 4 –	Médias e intervalo de confiança de 95% para a porcentagem de células por grupo.....	46
Figura 5 –	Médias (esquerda) e médias + intervalo de confiança de 95% (direita) para a porcentagem de células em relação ao total (CD68).....	48
Figura 6–	Resultados observados para a relação de células sobre o total (CD68) por grupo.....	49
Figura 7–	Distribuição do percentual de células de acordo com o tamanho tumoral.....	50
Figura 8–	Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre os tamanhos de acordo com o marcador.....	51
Figura 9–	Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre o tempo de evolução do tumor de acordo com o marcador.....	52

RESUMO

Padoveze EH. *Estudo do macrófago no carcinoma basocelular sólido recidivado após Cirurgia Micrográfica de Mohs*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: Os macrófagos associados aos tumores (MAT) sólidos estão relacionados à progressão ou à involução das neoplasias, dependendo da diferenciação em M1 ou M2. No carcinoma basocelular (CBC), as formas mais agressivas apresentam aumento de macrófagos às custas do fenótipo M2, se comparadas às formas não invasivas. O tratamento do CBC sólido pela Cirurgia Micrográfica de Mohs (CMM) proporciona elevados índices de cura, porém recidivas podem ocorrer. **OBJETIVOS:** Comparar a população total de macrófagos e as subpopulações M1 e M2 nos casos de CBC sólidos recidivados e não recidivados após exérese pela CMM. **METODOLOGIA:** Cortes histológicos obtidos a partir dos blocos de parafina de nove casos de CBC sólidos recidivados após CMM e de 18 casos de CBC sólido operados pela CMM não recidivados foram marcados imunoistoquimicamente para iNOS, CD204, CD163 e CD68. A expressão desses marcadores foi analisada pelo método de análise de imagens. **RESULTADOS:** Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à porcentagem média de células M1 (iNOS), células M2 (CD163 e CD204) e total de células (CD68). **CONCLUSÃO:** A recidiva dos tumores estudados não ocorreu por influência do MAT, mas pode ser decorrente da falha técnica na realização da CMM ou de algum outro mecanismo imunológico desconhecido.

Descritores: Carcinoma basocelular; Cirurgia de Mohs; Recidiva local de neoplasia; Macrófago.

SUMMARY

Padoveze EH. *Study of macrophages in solid basal cell carcinoma recurrent after Mohs Micrographic Surgery*. [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUCTION: The macrophages associated with solid tumors (MAT) are related to the progression or regression of tumors, depending on the differentiation in M1 or M2. In basal cell carcinoma (BCC), the most aggressive forms show an increase in macrophages at the expense of M2 phenotype compared to non-invasive forms. The treatment of BCC solid by Mohs micrographic surgery (MMS) provides high cure rates, but relapses can occur. **OBJECTIVES:** To compare the total population of macrophages and subpopulations M1 and M2 in cases of recurrent BCC solid and not recurrent after excision by MMS. **METHODS:** Histological sections obtained from paraffin blocks of 9 cases of recurrent solid CBC after MMS and 18 cases of solid CBC operated by MMS not relapsed were labeled immunohistochemically for iNOS, CD204, CD163 and CD68. The expression of these markers was analyzed by image analysis. **RESULTS:** No significant differences were found between the groups in relation to the average percentage of M1 cells (iNOS), M2 cells (CD163 and CD204) and total cells (CD68). **CONCLUSION:** The recurrence of the tumors studied did not occur under the influence of MAT, but may be due to technical failure in achieving MMS or some other unknown immune mechanism.

Descriptors: Basal cell carcinoma; Mohs Surgery; Local recurrence of neoplasia; Macrophage.

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de pele são as neoplasias mais comuns do ser humano. No Brasil, para o ano de 2014, a estimativa de incidência do câncer de pele não melanoma é de 98.420 casos entre os homens e 83.710 entre as mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 100,75 casos novos a cada 100 mil homens e 82,24 para cada 100 mil mulheres¹.

O carcinoma basocelular (CBC) é o câncer de pele mais comum e corresponde à cerca de 80% dessas lesões, seguido do carcinoma espinocelular (CEC), com incidência de 15%, e, mais raramente, do melanoma, que, em nosso meio, corresponde a 4% das malignidades cutâneas^{2,3,4}.

Dentre os tipos de CBC, o sólido é o subtipo histológico mais comum. Apresenta crescimento indolente e pequenos agrupamentos sólidos de células basaloides bem delimitados que conferem a esse tumor grande taxa de cura e baixo índice de recidiva². A face é o lugar mais comum para a ocorrência dessas lesões, sendo que 70% delas localizam-se no nariz e na frente.

A maioria desse tumor é curável, se diagnosticada e tratada prontamente. Entretanto, pode causar destruição tecidual quando não tratada de forma adequada⁵.

A técnica de Cirurgia Micrográfica de Mohs (CMM) tem se tornado o melhor método terapêutico para os cânceres de pele não melanoma⁶, com taxa de recorrência, em cinco anos, de 1% e 6% (CBC primários e recorrentes, respectivamente), enquanto na cirurgia convencional é de 10% e 17%, respectivamente⁷.

Na CMM, todo o processo é realizado pelo cirurgião micrográfico, que faz a retirada do tumor, o preparo da lâmina para congelamento, a análise microscópica e a reconstrução da ferida operatória. Nessa técnica, o tumor é

retirado, e as margens laterais e profundas são congeladas e mapeadas histologicamente, a fim de identificar possível tumor residual e sua exata localização. Nesse caso, uma nova fase cirúrgica é realizada, para remover somente os locais acometidos e, novamente, analisar o material. Caso haja manutenção da neoplasia, novas fases são realizadas até a sua completa remoção⁸. Todo esse processo é mais demorado que a cirurgia convencional, fazendo com que a CMM tenha suas indicações precisas.

Dentre as diversas indicações para a cirurgia micrográfica, destacam-se os casos em que o tumor tem características histológicas agressivas, margens mal delimitadas e lesões recidivadas, além dos casos em que as margens preconizadas pela técnica convencional removem mais tecido saudável do que o necessário, causando danos estéticos e funcionais importantes. Em todos os casos, a CMM realiza um mapeamento de 100% das margens, propiciando a completa remoção da lesão, o que se traduz por elevados índices de cura e também permite poupar tecido sã, gerando uma menor ferida cirúrgica⁹.

Embora a CMM permita uma análise de todas as bordas do tumor, recidivas podem ocorrer¹⁰ devido à dificuldade técnica do preparo e da leitura das lâminas histológicas durante o procedimento, que pode não permitir a visualização da totalidade das margens. Isso resultaria em tumor residual. Fatores como a presença de denso infiltrado inflamatório e a invasão de células neoplásicas no tecido perineural podem dificultar a visualização de células tumorais na lâmina em estudo, ocasionando maiores índices de falha terapêutica¹¹. Além disso, atualmente, tem-se observado que a progressão do CBC é dependente da resposta imune do hospedeiro e do infiltrado inflamatório tumoral¹².

Uma grande parcela dos tumores sólidos é composta por células não tumorais, incluindo células estromais (fibroblastos e células endoteliais) e leucócitos, em especial por macrófagos. Antigamente, os macrófagos associados ao tumor (MAT) estavam relacionados à resposta do hospedeiro ao crescimento tumoral; entretanto, vários estudos demonstraram que o

macrófago tem o potencial de destruir o tumor apenas quando apropriadamente estimulado¹³.

Sabe-se que os macrófagos podem se diferenciar em dois polos – M1 e M2¹⁴. A diferenciação do macrófago clássico (ou M1) pode ser decorrente de estímulo microbiano ou pelo *interferon-γ* (IFN-γ), que resultaria em elevada capacidade de apresentação de antígenos, aumento de interleucina-12 (IL-12), IL23 e elevada produção de mediadores tóxicos (óxido nítrico [NO], intermediadores da reação do oxigênio [ROI]). A produção dessas substâncias faz com que o macrófago M1 tenha um elevado poder destrutivo de micro-organismos e células tumorais^{14,15}.

Por outro lado, o macrófago M2 tem o papel de promover a angiogênese, remover detritos, remodelação do tecido e reparação. A diferenciação do monócito em macrófago M2 deve-se ao fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), IL4, IL-13, IL10, complexos imunes-TRL/IL-1R e glicocorticoides^{14,15}.

Geralmente, nos tumores, o MAT adquire o fenótipo M2 que desempenha um papel importante em muitos aspectos de crescimento e progressão tumoral¹⁶. Muito se tem estudado com relação ao MAT associado ao câncer de mama¹⁷, intestino¹⁸ e melanoma^{19,20}; por outro lado, são raros os trabalhos que avaliam a presença do fenótipo M2 no CBC¹². Além disso, não existem pesquisas que avaliam esse tipo de célula nos tumores recidivados pela técnica de Mohs.

J-W Tiju *et al.*¹² observaram que o número de MAT está correlacionado com a profundidade de invasão tumoral, densidade vascular e expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) nas células tumorais do CBC. Esse trabalho constatou que formas agressivas do CBC apresentam aumento de macrófagos se comparadas às formas não invasivas.

Com base nessa diferença populacional de macrófagos existente entre os subtipos histológicos de CBC, foram selecionados apenas os tumores sólidos e propõe-se um estudo para verificar a predominância de macrófagos M2 nos casos recidivados pela CMM.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

O objetivo deste trabalho é comparar a população de macrófagos M2 e M1 nos CBCs sólidos recidivados após CMM, com casos não recidivados.

2.2 Objetivo Secundário

Como objetivo secundário, pretende-se avaliar a diferença das populações de macrófagos, de acordo com o tamanho do tumor e o tempo de evolução da neoplasia.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Carcinoma Basocelular

A primeira descrição na literatura do CBC foi feita em 1827, pelo cirurgião irlandês Arthur Jacob. De acordo com ele, o CBC corresponde a um tumor maligno das células germinativas foliculares com baixa taxa de mortalidade²¹. Para Jacob, a maioria dos casos é indolente, entretanto alguns tumores podem ser agressivos, causando dano ao tecido local^{22,23} e, raramente, metástases (linfonodo, pulmão, fígado e ossos)^{24,25}.

3.1.1 Epidemiologia

O CBC é o câncer de pele mais comum e corresponde a cerca de 80% das lesões, seguido do CEC, com 15%, e do melanoma, que, em nosso meio, corresponde a 4%^{2,3,4}. Estima-se que um em cada quatro norte-americanos desenvolverá CBC ao longo da sua vida²⁶. Esse tipo de câncer acomete principalmente pessoas de pele clara (fototipo I de Fitzpatrick) e as maiores taxas de incidência ocorrem na Austrália (>1.000/100.000 pessoas) e as menores, na África (<1/100.000 pessoas)²¹.

Está associado à exposição à radiação ultravioleta. Nesse sentido, os locais mais vulneráveis ao aparecimento são cabeça e pescoço²⁷. Desses, a face é o lugar mais comum para as lesões: 70% delas localizam-se no nariz e na frente.

3.1.2 Etiologia

O principal fator de risco associado ao desenvolvimento do CBC é a exposição à radiação ultravioleta. Outras circunstâncias envolvidas com a sua etiologia são: predisposição genética (síndrome do nevo basocelular, síndrome de Bazex e xeroderma pigmentoso)²⁸, exposição ao arsênico, fatores ambientais (hidrocarbonetos e pesticidas), imunossupressão, injúrias (queimadura e trauma), exposição à radiação ionizante²⁹, fototipo baixo (cabelo, olhos e pele clara), sexo masculino, nevo sebáceo³⁰, idade avançada, exposição solar e queimaduras na infância^{31,32,33}.

3.1.3 Etiopatogenia

Múltiplas células estão implicadas na gênese do CBC e vários subtipos do CBC existem, incluindo nodular, superficial, esclerodermiforme e o fibroepitelioma de Pinkus. Uma explicação para essa variedade de subtipos baseia-se na teoria de que eles se originariam de diferentes tipos de células na pele.

Teorias atuais, apoiadas no modelo murinho, sugerem que o CBC surge das células totipotentes do folículo germinativo secundário, bulbo folicular, glândula sebácea e células basaloides interfoliculares da epiderme. Mesmo com várias células implicadas no desenvolvimento do CBC, uma característica comum a todos os tipos de CBC é a hiper-regulação da via de sinalização do *Hedgehog* (Hh)³⁴.

A Hh é uma via de sinalização que transmite informação para células embrionárias, afim de promover um adequado desenvolvimento. Diferentes partes do embrião possuem diferentes concentrações dessa proteína que

também está presente nos adultos³⁵. Recentemente, demonstrou-se que essa via de sinalização tem papel crucial na promoção da diferenciação das células totipotentes em adultos, em vários tecidos, inclusive nos folículos pilosos³⁶.

Mutações na Hh podem levar a uma hiper-regulação, resultando na síndrome genética autossômica dominante chamada síndrome de Gorlin-Goltz ou síndrome do nevo basocelular, na qual familiares desenvolvem de dezenas a milhares de CBC durante suas vidas³⁷.

A via de sinalização Hh, em sua fase de repouso, apresenta a proteína transmembrana PTCH1, inibindo constantemente a proteína G transmembrana, chamada *Smoothened* (SMO). Quando a PTCH1 está ligada a uma proteína solúvel SHH, ela se torna incapaz de suprimir a SMO, havendo, por sua vez, a ativação dos fatores de transcrição Gli, os quais promovem a progressão do ciclo celular³². Nos indivíduos com a síndrome de Gorlin-Goltz ocorre uma mutação no gene supressor tumoral PATCHED1, localizado no cromossomo 9q22, o qual produz a proteína PTCH1, que inibe a via de sinalização Hh^{38,39}, originando os tumores cutâneos.

Quase todos os CBCs analisados geneticamente apresentaram mutações que aumentam a indução da via de sinalização Hh: 90% dos CBCs esporádicos apresentam mutação na inativação de PTCH1 e 10%, mutação na ativação do SMO^{38,40,41,42,43,44}.

Outras síndromes genéticas, como a de Bazex-Dupré-Christol e a de Rombo, a hipoplasia cartilagem-cabelo e o xeroderma pigmentoso, estão associadas a um alto risco de CBC, ilustrando o envolvimento de fatores genéticos adicionais como reparo no DNA e na manutenção nos telômeros⁴⁵.

A perda completa do gene supressor tumoral p53 demonstrou, em estudos experimentais com ratos, uma hiperexpressão da via Hh pela ausente inibição do *smoothened* (SMO) na epiderme interfolicular, tornando assim esses queratinócitos propensos à indução do CBC⁴⁶.

Acredita-se que a interação da radiação ultravioleta B (UVB) e do DNA resulta na formação de pirimidinas. Essa mutação causa ativação inapropriada na via de Sinalização Hh, levando a sua atividade contínua⁴⁷.

3.1.4 Histopatologia

O CBC é composto por células uniformes com núcleo basofílico oval ou arredondado, maiores e mais escuros que o núcleo dos queratinócitos⁴⁸. Mitoses e células apoptóticas são frequentes⁴⁹ e, apesar de serem mais comuns nos tumores agressivos⁵⁰, não alteram o curso clínico dessa neoplasia⁵¹.

Ao redor dos ninhos tumorais, há um variável estroma fibromixóide que apresenta numerosos fibroblastos jovens. Muitas vezes, existem áreas de retração desse estroma, a partir das ilhas tumorais, resultando em lacunas peritumorais. Como essas lacunas são bastante típicas para alguns CBCs, a sua presença auxilia na diferenciação em relação a outros tumores, tais como o carcinoma de células escamosas. Além disso, depósitos de amiloide nesse estroma e no interior dos tumores são frequentemente encontrados⁵⁰.

Em mais de 90% dos casos, ocorre conexão entre as células tumorais e a superfície epidérmica⁵⁰. A camada celular periférica das massas tumorais frequentemente mostra um arranjo em paliçada, enquanto, no seu interior, a disposição celular ocorre ao acaso^{48,50}.

Existem diversos subtipos histológicos do CBC. Os mais comuns são: sólido, superficial, morfeiforme (esclerodermiforme), micronodular, infiltrativo, metatípico (basoescamoso) e pigmentado. Outros menos frequentes: queratótico, adenoide, com diferenciação sebácea, cístico, linear, adamantinoide, de células claras, com diferenciação matricial e o fibroepitelioma de Pinkus⁵⁰.

3.1.5 Carcinoma basocelular sólido

O tipo histológico mais comum do CBC é o sólido com ninhos tumorais lobulados, bem delimitados e irregulares, cercados por estroma denso, numerosos fibroblastos, material mucinoso e ácido hialurônico. A calcificação pode estar presente, particularmente em lesões de longa duração, entretanto esse fenômeno é mais frequente nos subtipos histológicos mais agressivos⁵⁰. A característica típica desse tipo histológico é a fenda de retração formada entre o tumor e o estroma.

O tumor basocelular sólido se estende a partir da epiderme à derme papilar e reticular. As células basaloídes formam uma paliçada na periferia e a distribuição central das células é caótica. No centro de ninhos tumorais grandes, muitas vezes, ocorrem áreas de necrose com a formação de espaços císticos contendo material mucinoso (carcinoma basocelular adenocístico)⁴⁸.

Clinicamente, o CBC sólido se apresenta comumente sob a forma clínica do CBC nodular, caracterizado por pápula ou placa perlácea bem delimitada com telangiectasias. Seu crescimento indolente e os pequenos agrupamentos sólidos de células basaloídes bem delimitados conferem a esse tumor grandes taxas de cura e baixos índices de recidiva².

3.1.6 Prognóstico relacionado ao subtipo histológico e recidiva

A recidiva é definida quando o CBC ocorre contiguamente ou adjacente à cicatriz de tratamento prévio^{52,53,54}. Sessenta e sete por cento das recidivas ocorrem nos primeiros três anos e 18% entre cinco e dez anos após o tratamento primário^{54,55}.

Os diferentes tipos histológicos do CBC apresentam prognósticos e índices de recorrência variados. O subtipo sólido é o mais comum, ocorrendo em aproximadamente 40% a 60% de todos os CBCs primários⁵⁶. O superficial representa 24% dos tumores primários e é mais comumente encontrado no tronco e nas extremidades. Esses dois subtipos são considerados menos agressivos, com menores taxas de recorrência que os demais.

Os subtipos infiltrativo, micronodular e esclerodermiforme ocorrem em cerca de 20% de todos os CBCs e têm grande poder destrutivo tecidual e altas taxas de recorrência⁵⁶. O basoescamoso (ou metatípico) corresponde a 1% a 2,5% dos CBCs, apresentando maior destruição local, risco de metástases e elevadas taxas de recorrência.

Muitos tumores possuem múltiplos subtipos histológicos e o subtipo mais agressivo sempre determina a opção de tratamento a ser adotada⁵⁷.

Além do subtipo histológico, a taxa de recidiva e o potencial destrutivo local também podem ser categorizados de acordo com a localização anatômica. Assim, os tumores localizados na área denominada “H” da face, que abrange o nariz, têmporas, orelha, região periocular, periauriculares, e lábios superiores são considerados de alto risco (Figura 1).

FONTE: Gross KG, Steinman HK, Rapini RP, 1999, p. 12.

Figura 1– Áreas em cinza correspondem ao “H” da face, locais com alto risco de recidiva para os carcinomas basocelulares

No couro cabeludo, no pescoço, na frente, no mento e nas regiões malaras, o risco é intermediário; e o tronco e as extremidades^{58,59} são de

baixo risco. O diâmetro é considerado um fator de risco independente para recorrência^{60,61}. Lesões maiores que 2 centímetros têm se mostrado como o maior fator de risco para recorrência^{62,63}.

3.1.7 Tratamento

O manejo do CBC deve ser norteado por fatores clínicos e histopatológicos que vão diferenciá-los em tumores de baixo ou alto risco de recidiva. A Tabela 1 demonstra os fatores de risco para recidiva.

Tabela 1 – Fatores de risco para recidiva do CBC

	Baixo risco	Alto risco
Fatores clínicos		
Localização/tamanho	Área L < 20mm Área M < 10mm Área H < 6mm	Área L ≥ 20mm Área M ≥ 10mm Área H ≥ 6mm
Bordas	Bem delimitadas	Mal delimitadas
Primário x recidivado	Negativo	Positivo
Imunossupressão	Negativo	Positivo
Tumor localizado na área de irradiação prévia	Negativo	Positivo
Fatores histopatológicos		
Envolvimento perineural	Negativo	Positivo
Subtipo	Sólido, superficial	Micronodular, esclerodermiforme, metatípico e infiltrativo

Área L: baixo risco de recidiva (tronco e extremidades)

Área M: médio risco de recidiva (couro cabeludo, pescoço, fronte, mento e regiões malares)

Área H: alto risco de recidiva (nariz, têmporas, orelha, região periocular, periauriculares, e lábios superiores)

A escolha do método terapêutico deve levar em conta, além dos fatores de risco para recidiva, as condições cirúrgicas do paciente, a taxa de cura, o custo e o resultado cosmético pós-tratamento.

O tratamento de escolha é a completa excisão cirúrgica⁶⁴, porém, nos doentes com risco cirúrgico elevado, a criocirurgia e a radioterapia podem ser uma opção terapêutica. Nesses pacientes e nos casos de CBC

superficial fora da área de risco, outras opções não cirúrgicas são: imiquimode e a terapia fotodinâmica⁶⁵.

Roozeboom *et al.*⁶⁶ fizeram uma revisão sistemática dos tratamentos tópicos do CBC superficial. A taxa de cura, utilizando-se o imiquimode, foi de 86% e da terapia fotodinâmica 79%.

Para os tumores não agressivos e menores que 2 cm de diâmetro, 4 milímetros de margens, proporcionam taxas de cura em torno de 98%⁶⁷. A curetagem e eletrocoagulação podem ser usadas no tratamento de lesões superficiais menores que 2 cm, em locais de baixo risco (tronco e extremidades)⁶⁵.

Nas lesões localizadas na cabeça e pescoço, a CMM é a melhor opção, pois proporciona avaliação histológica completa de todas as margens a serem removidas. Esse procedimento preserva a pele sadia em áreas com elevadas taxas de recorrência ("H" da face) e proporciona as menores taxas de recorrência em cinco anos, se comparadas a todas as outras opções terapêuticas (tumores primários, 1%, e tumores recidivados, 6%)⁷. Alguns autores defendem a CMM como o tratamento de melhor custo/benefício para o câncer de pele não melanoma de alto risco, se comparada à cirurgia convencional^{68,69}.

Para os casos irresssecáveis e metastáticos, além da radioterapia, uma nova opção é o vismodegibe, droga oral que se liga seletivamente ao SMO, inativando-o e inibindo a replicação tumoral⁷⁰.

3.2 Cirurgia Micrográfica de Mohs

A CMM foi desenvolvida pelo médico norte-americano Frederic E. Mohs, na Universidade de Wisconsin, durante a década de 1930. Publicado pela primeira vez em 1941, recebeu a denominação de quimiocirurgia⁷¹.

A técnica original consistia na retirada da massa tumoral, seguida da

aplicação de ácido dicloroacético no leito da lesão, para hemostasia. Uma vez controlado o sangramento, esse leito era fixado com a aplicação de cloreto de zinco, que deveria permanecer de seis a 24 horas para obter a fixação tecidual *in vivo*. Após esse período, retirava-se uma fina camada do leito fixado, incluindo margens laterais e profundas. O tecido era seccionado em múltiplos fragmentos e marcados, utilizando-se pigmentos com o propósito de orientação. Era criado um mapa detalhado do tumor ressecado, incluindo a orientação em relação ao tecido remanescente e a localização dos pigmentos. Com os fragmentos já identificados, eram achatados por meio de pressão física, de maneira que tanto as margens laterais como a profunda ficassem expostas. Esses espécimes eram então invertidos para o corte histológico com o auxílio de um micrótomo. Em seguida, as lâminas eram coradas pela hematoxilina-eosina e ou azul de toluidina, para serem submetidas a exame microscópico. Se houvesse tumor residual, a área acometida era novamente fixada para remoção, repetindo-se a sequência até a remoção total da lesão.

Apesar de a técnica ter demonstrado altos índices de cura em neoplasias agressivas, a fixação de tecido pelo cloreto de zinco apresentava limitações como: dor no momento da aplicação e retardo na reconstrução do defeito cirúrgico, devido à demora no procedimento. Diante disso, Mohs, em 1969, aprimorou sua técnica e publicou uma série de casos tratados com o exame de congelação do leito do tumor, dando origem à técnica a fresco⁷². Nesse trabalho, Mohs apresentou 70 tumores de pálpebra tratados pela técnica a fresco com 100% de cura após cinco anos.

Em 1974, Stegman e Tromovitch⁷³ publicaram uma série de 102 casos de CBC operados com a técnica a fresco com elevados índices de cura. A técnica com tecido a fresco congelado eliminou a necessidade da pasta de cloreto de zinco e, além disso, permitia uma remoção completa do tumor com ressecções múltiplas em um único dia, assim como a reconstrução do defeito operatório no final da cirurgia.

3.2.1 Descrição da técnica

A CMM deve ser iniciada após uma adequada avaliação pré-operatória. Primeiramente, com o auxílio de uma caneta marcadora, a porção visível do tumor é delimitada. Linhas de tensão, subunidades cosméticas e outros pontos de referência, que auxiliem o cirurgião, devem ser identificados antes da infiltração anestésica.

A anestesia, geralmente, é local e realizada com lidocaína 2%, epinefrina (1:1000) e soro fisiológico 0,9%. Essa solução permite anestesiar grandes áreas, oferecendo segurança quanto à toxicidade. Pode-se acrescentar bicarbonato de sódio na proporção de 1:9 com lidocaína, a fim de diminuir a dor da injeção causada pelo pH ácido da lidocaína. Dependendo da extensão do procedimento, das condições clínicas ou em casos de pacientes muito ansiosos, pode-se fazer a sedação ou anestesia geral.

A cirurgia, propriamente dita, inicia-se pela retirada do tumor visível, por meio da curetagem ou excisão com bisturi. A utilização da cureta auxilia o cirurgião a delimitar as margens subclínicas do tumor não visíveis a olho nu. É útil principalmente nos casos de CBC, devido ao tumor ser mais friável, podendo diminuir o número total de fases da cirurgia pela delimitação mais precisa entre pele sã e o tumor^{74,75}.

Após a retirada do tumor visível, a primeira fase da CMM é iniciada com a delimitação de 1 a 2 milímetros das margens. Em seguida, são feitas marcações perpendiculares à linha de incisão, que servirão como referência, no tecido perilesional. Tradicionalmente, são feitas marcações às 6 e 12 horas, para amostras pequenas, acrescidas de marcações às 3 e 9 horas, nos casos maiores. Após a marcação, a incisão com bisturi é feita com a lâmina em posição tangencial, em ângulo de 45°, de modo circunferencial, na direção da profundidade do tumor. Ao atingir a profundidade desejada,

corta-se a margem profunda paralelamente à superfície para a remoção da peça cirúrgica. O passo seguinte é a hemostasia e colocação de curativo provisório, enquanto se aguarda o processamento do espécime retirado.

Após a obtenção do material, ele deve ser colocado cuidadosamente sobre um papel que possua o desenho da localização do tumor. Em seguida, o cirurgião faz o mapa de Mohs, desenho que reproduz localização, forma, tamanho e orientação anatômica do tumor; divisão dos fragmentos; e codificação das cores. Depois, os fragmentos são pintados com cores diferentes e vão para a congelação no criostato.

As peças são incluídas invertidas nos pinos de suporte, ou seja, a superfície de corte é colocada voltada para cima, interessando ao exame da margem profunda e periférica. Um mínimo de três cortes é desejável, e estes serão submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina e/ou azul de toluidina. Uma vez prontas, as lâminas são lidas pelo próprio cirurgião. Os resultados devem ser anotados no mapa, onde se marcam eventuais áreas positivas.

Em caso de margem lateral ou profunda comprometida, uma nova fase cirúrgica faz-se necessária. A localização exata do tumor residual, observado no microscópio, é transposta ao mapa de Mohs. Utilizando as marcações na pele, ao lado da ferida, tem-se uma estimativa do local da neoplasia residual e uma nova fase cirúrgica é realizada. Nesse momento, retira-se nova porção de pele com uma pequena margem (1 a 2 mm) de área sã ao redor do sítio presuntivamente envolvido.

Uma vez que as margens livres são confirmadas, histologicamente, a reconstrução é planejada e concluída.

3.2.2 Indicações para a Cirurgia Micrográfica de Mohs

A CMM pode ser utilizada no tratamento dos seguintes tumores: angioendotelioma; angiossarcoma; adenocarcinoma écrino; carcinoma adenocístico; carcinoma anexial microcístico; carcinoma apócrino; CBC; carcinoma epidermoide; carcinoma sebáceo; carcinoma de Merkel; carcinoma sebáceo; carcinoma verrucoso; dermatofibrossarcoma protuberans; doença de Bowen; Paget extramamário; fibrohistocitoma maligno; hemangioendotelioma; hemangiossarcoma; queratoacantoma; leiomiiossarcoma; schwanoma maligno; tumor glômico; melanoma maligno; e fibroxantoma atípico.

2 – Indicações gerais da CMM

A maioria dos cânceres não melanoma são tratados com técnicas ablativas superficiais como curetagem e eletrocoagulação ou crioterapia. Essas técnicas produzem elevadas taxas de cura e bom custo/benefício para o manejo da maioria dos cânceres de baixo risco²². Entretanto, a CMM é considerada o melhor método terapêutico para os cânceres de pele com alto índice de recidiva. A definição de alto risco depende de múltiplos fatores, incluindo: características do tumor e do paciente, sítio anatômico e história prévia de tratamento.

3.2.3 Indicações devido à característica do tumor

A CMM é muito eficaz para a remoção de uma grande variedade de tumores cutâneos, devido a sua habilidade de rastrear e remover pequenos focos tumorais, crescendo contiguamente em diferentes direções. Os subtipos histológicos agressivos e infiltrativos costumam ter esse comportamento, uma vez que apresentam extensões profundas e laterais imprevisíveis. Os subtipos histológicos mais agressivos para os CBC e CEC são:

- **CBC:** esclerodermiforme, micronodular, metatípico e

infiltrativo;

- **CEC:** indiferenciados, mal diferenciados, acantolíticos, de células fusiformes e com invasão perivascular e perineural.

Além disso, tumores de longa duração, margens mal definidas, com crescimento rápido e infiltrativo, também costumam apresentar extensões subclínicas imprevisíveis, podendo ir muito além dos seus limites clínicos, apresentando indicação para a CMM. Tumores de pele não melanoma (CBC e CEC), maiores que 2 centímetros no tronco e nas extremidades, que 1 centímetro na face e que 0,4 centímetros nas áreas de alto risco têm indicação para CMM.

Tumores recidivados apresentam taxa de cura maior, quando operados pela CMM, em comparação com os realizados por meio da cirurgia convencional (respectivamente 90% e 83%). A mesma indicação de CMM se dá para os tumores que foram removidos de forma incompleta, em que é necessário localizar o tumor residual e removê-lo.

3.2.4 Indicações devido à localização anatômica

A CMM é indicada para os tumores com alto índice de recidiva e/ou metástase, como, por exemplo, localizados em áreas de fenda embrionária; “H” da face (periorbitária, orelhas, têmporas, periauricular, nariz, periauricular e supralabial); e áreas com pele adjacente à cartilagem ou ao osso.

Outras indicações, com relação ao sítio anatômico, são os lugares onde a preservação tecidual é imperativa, como dedos das mãos e pés, genitais, anal, e onde a margem cirúrgica convencional remove mais tecido saudável do que o necessário, causando danos estéticos e funcionais importantes.

Tumores originados em locais com exposição prévia à radiação ionizante e com cicatriz crônica (úlceras de Marjolin) têm as suas margens laterais difíceis de serem delimitadas, sendo uma boa indicação para CMM.

3.2.5 Indicações devido ao paciente

Pacientes portadores de síndromes genéticas (por exemplo, xeroderma pigmentoso, síndrome do nevo basocelular, síndrome Bazex-Dupre-Cristol) com múltiplos tumores se beneficiam do tratamento com a cirurgia micrográfica devido ao fato de poupar tecido são. Também são indicações de CMM, tumores em pacientes imunossuprimidos (mais agressivos e frequentes).

3.2.6 Falhas na CMM

Embora a CMM permita uma análise de todas as bordas do tumor, recidivas podem ocorrer¹⁰, devido à dificuldade técnica do preparo e à leitura das lâminas histológicas, prejudicando a visualização da totalidade das margens. Isso resultaria em tumor residual. Fatores como a presença de denso infiltrado inflamatório e a invasão de células neoplásicas no tecido perineural podem dificultar a visualização de células tumorais, ocasionando falha terapêutica¹¹.

Zachary *et al.*⁷⁶, utilizando técnicas de imunoistoquímica, observaram células tumorais isoladas ou agrupadas de CEC em áreas onde a hematoxilina-eosina demonstrou apenas processo inflamatório. Entretanto, o achado de infiltrado inflamatório não necessariamente indica a presença de células tumorais. Inflamação pode também ocorrer em áreas de ulceração

ou biópsia prévia⁷⁷.

3.3 Macrófago

Os macrófagos, também denominados histiócitos, são originados a partir da medula óssea; os seus precursores, os monócitos, circulam no sangue e, posteriormente, entram nos tecidos, onde se transformam em macrófagos. Sob estímulo adequado, os monócitos podem se desenvolver em macrófagos na pele, o que envolve um considerável aumento no tamanho da célula e alterações na composição e arquitetura celular, com aumento nas enzimas lisossômicas, tais como B-glicuronidase, fosfatase alcalina, lisozima e arilsulfatase^{80,78}.

O tamanho médio do macrófago é de 20 a 80 microns de diâmetro. O núcleo é alongado, vesicular e palidamente corado, com um envoltório nuclear nitidamente visível^{80,78}.

3.3.1 Macrófago Associado ao Tumor

O acúmulo de subpopulações de leucócitos é a marca de várias condições patológicas, incluindo os tumores^{78,79}. Uma grande parcela das neoplasias sólidas é composta por células não tumorais, células estromais (fibroblastos e células endoteliais) e leucócitos, em especial por macrófagos. Inicialmente, os MATs estavam relacionados à resposta do hospedeiro frente ao crescimento tumoral, entretanto, estudos recentes demonstraram que o macrófago tem o potencial de destruir o tumor apenas quando apropriadamente estimulado¹³.

Em vários modelos experimentais de tumores, a ativação da resposta inflamatória (mais frequentemente mediada pelos macrófagos) é essencial para a completa transformação neoplásica e sua progressão^{79,80}. Além disso, o alto número de macrófagos está correlacionado à elevada densidade de vasos e à progressão tumoral¹³.

3.3.2 Recrutamento dos monócitos ao local do tumor

Os MATs foram primeiramente descritos na década de 1980^{81,82}. Essas células são recrutadas ao local do tumor pelos fatores quimiotáticos dos monócitos produzidos pelas células neoplásicas¹³. A CCL2 é a citocina mais frequentemente encontrada nos tumores. A maioria dos carcinomas humanos produzem CCL2 e seus níveis estão correlacionados com o aumento da infiltração macrofágica^{14, 83,84}.

Inúmeras outras citocinas já foram detectadas em tecidos neoplásicos e são produzidas pelo tumor ou por suas células estromais. Essas moléculas desempenham um papel importante em relação à estimulação do crescimento tumoral, promoção da inflamação e indução da angiogênese¹³.

Em geral, as citocinas derivadas dos tumores interagem com os receptores de tirosinaquinase, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF). Esse estímulo promove o recrutamento de macrófagos, a sua sobrevivência e proliferação^{85,86}.

Nowicki *et al.*⁸⁷ demonstraram que a depleção do M-CSF diminui o infiltrado de macrófagos M2 no sítio tumoral, retardando a progressão do tumor. Em contraste, o aumento da expressão do M-CSF causa um

aumento dramático do número desse fenótipo de macrófagos e, consequentemente, do crescimento neoplásico^{87,88}.

3.3.3 Propriedades distintas dos macrófagos M1 e M2

Os macrófagos podem se diferenciar em dois polos – M1 e M2¹³ – à semelhança do linfócito T auxiliar (Th) 1 e 2. A diferenciação do macrófago clássico, ou M1, pode ser decorrente de estímulo microbiano ou pelo IFN- γ , que resultaria em: elevada capacidade de apresentação de antígenos, aumento de interleucina-12 (IL-12), IL23, elevada produção de mediadores tóxicos (NO e ROI). A produção dessas substâncias faz com que o macrófago M1 tenha um elevado poder destrutivo de micro-organismos e células tumorais^{13,89}.

Por outro lado, o macrófago M2 tem o papel de promover a angiogênese, remover detritos, remodelação do tecido e reparação. A diferenciação do monócito em macrófago M2 deve-se à estimulação pelo fator de crescimento específico (M-CSF), IL4, IL-13, IL10, complexos imunes-TRL/IL-1Re glicocorticoides^{13,89} (Figura 2).

FONTE (adaptado de): Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. Eur J Cancer. 2006;42:717-27.

Figura 2 – Esquema demonstrando a diferenciação dos monócitos de acordo com a citocina estimulante. Na presença de interferon- γ (IFN γ) e produtos bacterianos, os monócitos são diferenciados em macrófago M1. Na presença de fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), interleucina 4, 10 e 13 (IL-4, IL-10, IL-13), corticosteróides e vitamina D3, os monócitos são diferenciados em macrófago M2. Os subtipos M1 e M2 diferem-se com relação ao fenótipo e a função. Células M1 têm elevado poder anti-bacteriano, imuno-estimulatório e de promover citotoxicidade tumoral. Células M2 têm elevada capacidade de remover detritos, estimular a neoangiogênese e, promover a remodelação e a reparação tecidual.

A diferença entre essas duas populações de macrófagos pode ser demonstrada por meio da imunoistoquímica, processo pelo qual os macrófagos M1 expressam a forma induzida da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) e os macrófagos M2 são evidenciados pelos marcadores CD163, CD204^{12,17}. Toda a população de macrófagos expressa moléculas intracitoplasmáticas, tais como CD 68 e KP1⁸⁰.

3.3.4 MAT e o CBC

Geralmente, nos tumores, o MAT adquire o fenótipo M2 que desempenha um papel importante em muitos aspectos de crescimento e progressão tumoral¹⁶. Muito se tem estudado com relação ao MAT associado ao câncer de mama¹⁷, de intestino¹⁸ e ao melanoma^{19,20}, entretanto são raros os trabalhos que avaliam a presença do fenótipo M2 no CBC¹².

J-W Tiju *et al.*¹² demonstraram que o número de MAT está correlacionado à profundidade de invasão tumoral, à densidade vascular e à expressão da COX-2 nas células tumorais do CBC. Esse trabalho constatou que formas mais agressivas do CBC apresentam aumento de macrófagos, se comparado às formas não invasivas. A hipótese é que o MAT ativaria a COX-2 nas células do CBC, aumentando a invasão e angiogênese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

O trabalho foi um estudo de coorte retrospectiva.

4.2 Casuística

Foram estudados os pacientes submetidos à CMM, no Hospital do Servidor Público Municipal (HSPM), no período de 1996 a 2007, que apresentaram recidiva do CBC sólido após exérese pela técnica de CMM (Tabela 2). Analisaram-se: sexo e idade dos pacientes; características do tumor (localização anatômica, tamanho, tempo de evolução da doença); número de fases da CMM; tempo da recidiva; e macrófagos M1 e M2.

Durante o período em estudo, realizaram-se cerca de 500 CMM para CBC. Os tumores foram operados por cirurgiões diferentes e as lâminas avaliadas pelo mesmo cirurgião micrográfico em todos os casos. Vinte e três casos recidivaram, dentre os quais, 11 eram de CBCs sólidos e o restante superficial, esclerodermiforme e micronodular.

Tabela 2 – Casos recidivados de CBC após exérese pela CMM no HSPM entre 1996 e 2007

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Localização	Tempo de recidiva (meses)	Tipo histológico
1	59	M	Dorso do nariz	34	Sólido
2	71	M	Temporal D	39	Sólido
3	70	M	Epicanto D	44	Superficial multifocal

(continua)

Tabela 2– Casos recidivados de CBC após exérese pela CMM no HSPM entre 1996 e 2007
(continuação)

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Localização	Tempo de recidiva (meses)	Tipo histológico
4	62	F	Asa nasal D	23	Sólido
			Asa nasal E	18	Micronodular
5	52	F	Malar E	26	Sólido
6	48	F	Malar D	13	Esclerodermiforme
7	74	M	Temporal D	72	Micronodular
8	82	M	Pálpebra inferior E	47	Sólido
9	75	M	Dorso do nariz	9	Micronodular
10	66	F	Asa nasal E	13	Esclerodermiforme
			Lábio sup. D	20	Sólido
			Parede nasal D	15	Sólido
11	65	M	Pálpebra inferior D	26	Sólido
12	71	F	Asa nasal E	30	Sólido
13	63	F	Epicanto E	44	Superficial
14	79	F	Lábio sup. E	18	Sólido
15	66	M	Ponta do nariz	10	Esclerodermiforme
			Ponta do nariz	14	Esclerodermiforme
16	64	M	Pré-auricular E	24	Sólido
17	60	F	Ponta do nariz	7	Esclerodermiforme
18	71	M	Malar D	17	Micronodular
19	64	M	Epicanto D	84	Esclerodermiforme

M: masculino; F: feminino; D: direita; E: esquerda

Dois casos dos CBCs sólidos foram excluídos do estudo devido à má conservação dos blocos de parafina e impossibilidade de utilização, restando apenas nove casos.

Diante desses dados, o estudo foi estruturado em dois grupos: 1) Grupo Estudo (Tabela 3), composto dos nove casos de CBC sólido recidivado entre os anos de 1996 e 2007; e 2) Grupo Controle (Tabela 4), representado por 18 casos de CBC sólido, obtidos de maneira aleatória do total de cirurgias de Mohs, realizadas no mesmo período, em que não houve recidiva da neoplasia. A pesquisa incluiu os pacientes que foram

acompanhados por cinco anos da cirurgia pelo maior risco de recidiva nesse período.

Tabela 3– Casos de CBC sólidos recidivados incluídos no Grupo Estudo

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Localização	Tempo de recidiva (meses)	Tipo histológico	Tamanho (cm)	Número de fases do Mohs	Tratamento prévio
1	59	M	Dorso do nariz	34	Sólido	1,3	4	Sim
2	71	M	Temporal D	39	Sólido	2,3	4	Não
3	62	F	Asa nasal D	23	Sólido	2,2	1	Não
4	52	F	Malar E	26	Sólido	1	1	Não
5	66	F	Lábio sup. D	20	Sólido	1,2	2	Não
			Parede nasal D	15	Sólido	1,5	1	Sim
6	65	M	Pálpebra inferior D	26	Sólido	3,5	4	Não
7	71	F	Asa nasal E	30	Sólido	1,1	2	Sim
8	64	M	Pré-auricular E	24	Sólido	1,2	1	Não

M: masculino; F: feminino; D: direita; E: esquerda

Tabela 4– Casos de CBC sólido não recidivados incluídos no Grupo Controle

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Localização	Tempo de evolução (meses)	Tipo histológico	Tamanho (cm)	Número de fases do Mohs	Tratamento prévio
1	74	F	Dorso nasal	12	Sólido	1	1	Não
2	58	M	Parede nasal E	4	Sólido	1,5	1	Sim
3	70	M	Parede nasal D	3	Sólido	1,3	1	Não
4	47	F	Frontal E	6	Sólido	1,7	2	Não
			Temporal D	6	Sólido	1,4	2	Não
5	76	F	Sulco nasogeniano	12	Sólido	0,8	1	Não
6	59	F	Epicanto E	2	Sólido	1	1	Não

(continua)

Tabela 4– Casos de CBC sólido não recidivados incluídos no Grupo Controle

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Localização	Tempo de evolução (meses)	Tipo histológico	Tamanho (cm)	Número de fases do Mohs	Tratamento prévio
7	73	F	Pálpebra superior D	5	Sólido	1	1	Não
8	68	F	Mandibular E	6	Sólido	1,6	2	Sim
9	62	F	Fronte	11	Sólido	1,4	2	Não
10	73	M	Tórax anterior	6	Sólido	2,8	1	Não
11	83	M	Perioral	12	Sólido	1,2	1	Sim
12	66	M	Canto externo olho E	15	Sólido	1,5	1	Não
13	79	M	Dorso nasal	12	Sólido	0,7	3	Sim
14	62	M	Orelha E	120	Sólido	3	2	Não
15	71	M	Temporal E	60	Sólido	2,8	2	Sim
16	70	F	Dorso nasal	12	Sólido	0,5	1	Não
17	71	M	Epicanto E	5	Sólido	0,5	2	Não

M: masculino; F: feminino; D: direita; E: esquerda

4.3 Procedimento

Os parâmetros clínicos analisados no estudo foram coletados a partir da revisão dos prontuários.

Cortes histológicos, obtidos a partir dos blocos de parafina dos tumores, foram corados pela hematoxilina e eosina e avaliados por um dermatopatologista para confirmar o diagnóstico de CBC sólido. Em seguida, cortes subsequentes foram feitos para a realização das reações de imunoistoquímica, a fim de demonstrar a população de macrófagos M1 e M2 no infiltrado peritumoral.

Os macrófagos M1 foram demonstrados pela expressão da forma induzida da iNOS e os macrófagos M2 foram evidenciados pelos marcadores CD163 e CD204^{12,17}. Toda a população de macrófagos foi demonstrada pelo anticorpo CD68. O painel de anticorpos utilizados está representado na Tabela 5.

Tabela 5—Anticorpos utilizados

Anticorpo	Código/clone	Marca	Diluição
CD163	clone 10D6	Leica Mycrosystems	1:150
CD204	SRA-E5	Trans Genic	1:200
iNOS	482728	Merk Millipore	1:1000
CD68	KP1	Cell Marque	1:150

Foi utilizado o sistema de revelação LSAB+system— HRP, *DakoCytomation*, (Carpinteria, CA, EUA, código K0690) e o cromógeno diaminobenzidina.

Todas as reações foram realizadas com cortes histológicos de controles positivos para os respectivos anticorpos. Os controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários, que foram substituídos por imunoglobulinas isotípicas nos procedimentos das reações.

4.4 Protocolo de Realização da Técnica de Imunoistoquímica

Cortes histológicos de 4micrômetros (μm) de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e colhidos em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. A3648) a 2%. Em seguida, os cortes histológicos foram desparafinizados em dois banhos de xilol, de 20 e 10 minutos, respectivamente, à temperatura ambiente. Na

sequência, os espécimes foram hidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95% e 70%) e lavados em água corrente por cinco minutos.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos, em calor úmido, em banho-maria a 95°C, por 20 minutos. As lâminas utilizadas para a identificação de CD68 e CD163 foram colocadas na solução *Target Retrieval Solution* pH 9,0 (cód. S2367, *DakoCytomation*, Carpinteria, CA, USA,) e as lâminas para iNOS e CD204 foram imersas na solução *Target Retrieval Solution* (cód. S1699, *DakoCytomation*, Carpinteria, CA, USA).

As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7.4.

Em seguida, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado (Molico, Nestlé®) a 10%, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários: CD68 (clone KP-1, cód. 168M-96, *Cell Marque*, Rocklin, CA, USA) na diluição 1:150; CD163 (clone 10D6, cód. NCL-CD163, *Leica Microsystems*, Newcastle Upon Tine, UK), na diluição 1:150; CD204 (clone SRA-E5, cód. KAL-KT022, *Trans Genic*, Tokyo, Japan) com diluição 1:200; e iNOS (Cód. 482728, *Merk Millipore*, Darmstadt, Germany) diluído a 1:1000. Todos os anticorpos foram diluídos em BSA fração V (SERVA. 1930) 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS pH 7.4, “over-night” a 4°C.

Após o procedimento de lavagem das lâminas por duas vezes em tampão PBS pH 7.4, durante cinco minutos cada, procedeu-se à incubação com o anticorpo pós-primário (*Novolink Max Polymer Detection System*, cód. K0690, *Leica Microsystems*, Newcastle Upon Tine, UK) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão PBS pH 7.4, por duas vezes, durante cinco minutos cada, e incubadas com o polímero (*Novolink Max Polymer Detection System*, cód. RE7280-K, *Leica Microsystems, Newcastle Upon Tine*, UK) pronto para uso, em câmara úmida, durante 30 minutos, à temperatura ambiente.

Logo depois, os sítios de ligações foram revelados com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidine, *SIGMA Chemical Co.*, St. Louis, MO/USA, cód. D5637) 0,03%, acrescida de 1,2 mL de água oxigenada 3%.

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, contracoradas com Hematoxilina de Carazzi por 20 segundos para, posteriormente, serem lavadas mais uma vez em água corrente e secas à temperatura ambiente.

A montagem das lâminas foi feita com resina *Permount* (*FISHER Scientific, Fair Lawn*, NJ/USA, cód. SP15-100).

4.5 Análise Semiquantitativa dos Macrófagos M1 e M2

A porcentagem de área corada para os anticorpos CD68, CD 204, iNOS e CD 163 foi avaliada por análise de imagem com base em limites de cores. Optou-se por usar os percentuais de acordo com as áreas para esses anticorpos, porque, em todas as colorações, foram observadas células com extensões citoplasmáticas que poderiam ser ressaltadas pela contagem convencional de células. As medições foram feitas com o *software Image Pro Plus* versão 4.1 para *Windows* (*netics mídia cibernético, Silver Spring*, MD, EUA) em um PC conectado a uma câmera digital (*Zeiss, AxioCam MRc*, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico (*Zeiss, Axiophot*, Alemanha).

Para cada anticorpo, as células foram contadas em 15 campos selecionados aleatoriamente e alocados ao lado de ninhos tumorais com uma ampliação de 40X. Todas as colorações, nas amostras de tecido codificadas, foram digitalizadas como imagens codificadas. A análise das imagens foi baseada em limites de cores, evitando assim a subjetividade.

4.6 Análise Estatística

Foram realizadas análises exploratórias de dados (média, desvio padrão, mínimo, mediana, máximo, frequências e porcentagens) e construídos gráficos de valores individuais e gráficos de barras com a média e o intervalo de confiança de 95%. As análises comparativas entre os grupos de Controle e de Estudo foram realizadas por meio do teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. A análise comparativa entre os grupos de tamanho do tumor e tempos de aparecimento foi efetuada pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Para o tamanho dos tumores, um coeficiente de correlação de *Pearson* foi também calculado.

O teste não paramétrico foi utilizado porque é menos influenciado por possíveis valores extremos nos dados. Outro motivo para o seu uso deve-se ao fato de que algumas das variáveis não seguem aproximadamente uma distribuição normal. Para verificação da normalidade dos dados foi utilizado o teste de *Shapiro Wilks*.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Descritiva/ Caracterização das Amostras

Foram estudadas nove lesões no grupo Estudo e 18 lesões no grupo Controle, totalizando oito pacientes no primeiro grupo e 17 no segundo. Um paciente do grupo Estudo apresentou recidiva de duas lesões em sítios diferentes e um paciente do grupo Controle teve dois tumores analisados. A média de idade dos pacientes foi bastante similar entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6—Estatísticas descritivas da idade dos pacientes

Variável	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Estudo	18	67,2	9,8	47,0	70,0	83,0
Controle	9	64,7	6,4	52,0	65,0	71,0

As proporções entre os gêneros foram idênticas no grupo Estudo e bastante similares no grupo Controle. Em relação ao tempo de evolução da neoplasia (no caso do grupo Estudo, tempo de recidiva), há uma maior proporção para resultados menores que um ano no grupo Controle. Para o número de fases na CMM, uma maior proporção de resultados do grupo de Estudo para a fase 4. E, em relação ao tamanho, também não se observaram grandes diferenças entre as proporções. A Tabela 7 ilustra os resultados observados.

Tabela 7—Frequências e porcentagens para o perfil dos sujeitos

Variável	Categoria	Estudo		Controle	
		N	%	n	%
Gênero	Feminino	4	50,0	8	47,0
	Masculino	4	50,0	9	53,0
Tempo	Menor que 1	3	33,3	12	66,7
	De 1 a 2 anos	4	44,4	4	22,2
	Mais de 4	2	22,2	2	11,1
Fase	1	4	44,4	10	55,6
	2	2	22,2	7	38,9
	3	0	0,0	1	5,6
	4	3	33,3	0	0,0
Tamanho	≤1 cm	1	11,1	7	38,9
	>1 e <2 cm	5	55,6	8	44,4
	≥2 cm	3	33,3	3	16,7

Os tumores localizaram-se principalmente na face, com exceção de um caso do grupo Controle, que ocorreu no tronco. A distribuição dos tumores, de acordo com a localização anatômica, encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8—Frequências e porcentagens para a localização dos tumores

Localização	Estudo		Controle	
	n	%	n	%
Nariz	4	44,4	5	27,7
Fronte	0	0,0	1	5,5
Temporal	1	11,1	2	11,1
Periorbitária	1	11,1	4	22,2
Perioral	1	11,1	2	11,1
Periauricular	1	11,1	1	5,5
Tronco	0	0,0	1	5,5
Malar	1	11,1	1	5,5

5.2 Comparações entre os Grupos por Tipo de Célula (M1 ou M2) e no Geral

A porcentagem de células (M1 e M2) foi comparada entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9—Estatísticas descritivas e resultados da comparação entre os grupos

Célula / Variável	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor ⁽¹⁾
M1 (%_INOS)	Controle	0,40	0,47	0,00	0,26	2,06	0,939
	Estudo	0,48	0,87	0,00	0,14	2,74	
M2 (%_CD163)	Controle	2,26	1,28	0,02	2,33	4,35	0,487
	Estudo	2,71	2,46	0,38	2,10	8,00	
M2 (%_CD204)	Controle	0,89	0,60	0,00	0,92	2,32	0,898
	Estudo	1,21	1,51	0,07	0,67	3,90	
M1 + M2 (%_CD68)	Controle	3,15	2,06	0,71	3,09	8,59	0,738
	Estudo	3,29	2,77	0,68	2,01	9,22	

⁽¹⁾Teste não paramétrico de *Mann Whitney*

Os p-valores superiores a 5% indicam que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à porcentagem média de células M1 (INOS), células M2 (CD163 e CD204) e total de células (CD68).

As Figuras 3 e 4 demonstram os resultados observados para a porcentagem de células, média e o intervalo de confiança de 95% por grupo.

Figura 3 – Resultados observados para a porcentagem de células por grupo

Figura 4 – Médias e intervalo de confiança de 95% para a porcentagem de células por grupo

5.3 Comparações entre os Grupos para a Relação das Células (M1 ou M2) em Comparação ao Total

Foram analisadas as porcentagens de células (M1 ou M2), de acordo com o anticorpo (iNOS, CD204 e CD 163), em relação ao total de macrófagos (CD68)(Tabela 10).

Tabela 10—Estatísticas descritivas e resultados da comparação entre os grupos

Célula / Variável	Grupo	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor ⁽¹⁾
M1 (%_iNOS)/ (%_CD68)	Controle	0,23	0,43	0,00	0,08	1,86	0,817
	Estudo	0,12	0,09	0,00	0,11	0,30	
M2 (%_CD163)/ (%_CD68)	Controle	0,85	0,66	0,02	0,70	2,75	0,738
	Estudo	1,15	1,19	0,16	0,85	3,98	
M2 (%_CD204)/ (%_CD68)	Controle	0,37	0,32	0,00	0,31	1,11	0,817
	Estudo	0,43	0,60	0,05	0,15	1,94	

⁽¹⁾Teste não paramétrico de *Mann Whitney*

Os p-valores superiores a 5% (Tabela 10) indicam que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Controle e Estudo em relação à razão da porcentagem média de células M1 ao total (iNOS/CD68) e células M2 ao total (CD163/CD68 e CD204/CD68).

Os gráficos (Figuras 5 e 6) demonstram os resultados observados para as médias (esquerda) e médias + intervalo de confiança de 95% (direita) para a porcentagem de células em relação ao total (CD68).

Figura 5 – Médias (esquerda) e médias + intervalo de confiança de 95% (direita) para a porcentagem de células em relação ao total (CD68)

Figura 6—Resultados observados para a relação de células sobre o total (CD68) por grupo

5.4 Comparação entre o Tamanho dos Tumores

Foi calculado o coeficiente de correlação de *Pearson* para avaliar a relação entre o tamanho dos tumores e cada uma das variáveis do estudo. Os resultados indicaram correlações ligeiramente negativas para todas as variáveis, no entanto, baixas e não significativas (Tabela 11).

Tabela 11—Coeficientes de correlação de Pearson (r) e p-valores

Variável	Correlação (r)	p-valor
% CD68	-0,247	0,214
%INOS	-0,143	0,476
%CD163	-0,055	0,786
%CD204	-0,125	0,536

Figura 7 – Distribuição do percentual de células de acordo com o tamanho tumoral

Ao realizar a divisão dos tamanhos em três grupos (≤ 1 cm, de 1 a 2 cm e ≥ 2 cm) também não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à média de porcentagem para nenhuma das variáveis (Tabela 12).

Tabela 12—Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre os tamanhos por variável

Variável	Tamanho do tumor						p-valor ⁽¹⁾
	≤1 cm (n=8)		1 a 2 cm (n=13)		≥ 2 cm (n=6)		
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
% CD68	2,8	1,6	4,1	2,7	1,8	0,9	0,179
%INOS	0,4	0,3	0,6	0,8	0,2	0,2	0,756
%CD163	2,1	1,7	2,7	1,0	2,3	3,0	0,396
%CD204	1,0	0,7	1,0	0,9	1,1	1,5	0,875

⁽¹⁾ Teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*

Figura 8—Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre os tamanhos de acordo com o marcador

5.5 Comparação entre o Tempo de Aparecimento dos Tumores

Todos os casos foram divididos em três grupos, de acordo com o tempo de aparecimento (< 1 ano; 1-2 anos; e >4 anos). A média e o desvio padrão de cada grupo foram avaliados, conforme o anticorpo, e comparados entre si (Tabela 13).

Tabela 13—Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre o tempo de aparecimento do tumor por variável

Variável	Tempo de aparecimento do tumor						p-valor ⁽¹⁾
	<1 ano (n=15)		De 1 a 2 anos (n=8)		>4 anos (n=4)		
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	
% CD68	3,3	2,3	2,6	1,6	4,1	3,5	0,757
%INOS	0,4	0,5	0,4	0,3	0,8	1,3	0,961
%CD163	2,7	2,0	2,6	1,4	1,0	0,6	0,123
%CD204	1,0	1,0	1,1	1,2	0,7	0,5	0,892

⁽¹⁾Teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação à média de porcentagem para nenhuma das variáveis.

Figura 9 –Médias, desvios padrão e resultado da comparação entre o tempo de evolução do tumor de acordo com o marcador

6 DISCUSSÃO

6.1 Aspectos Gerais das Recidivas

A recidiva do câncer resulta da persistência do tumor original após exérese incompleta⁹⁰. O percentual de recidiva varia de acordo com a modalidade terapêutica instituída. Para os CBCs primários, a falha terapêutica é de 10,1% com a excisão cirúrgica; 7,5%, criocirurgia; 7,7%, curetagem e eletrocoagulação; e 8,7%, radioterapia⁹¹. As taxas correspondentes ao CBC recidivado são: excisão cirúrgica, 17,4%; criocirurgia, 13%; curetagem e eletrocoagulação, 40%; e radioterapia, 9,8%⁹².

O uso da CMM no HSPM, ao longo dos 11 anos de estudo, resultou em uma taxa de recidiva de 4,6% em cinco anos, ou seja, valores abaixo dos de outras modalidades terapêuticas e semelhantes aos de outros centros europeus e norte-americanos, que relataram taxas de 1% – 3,2% para os tumores primários e 4,8% – 6,7% para tumores recorrentes, usando as mesmas técnicas cirúrgicas e indicações para CMM^{93,94,95}. A ausência de dados referentes a tratamentos anteriores, em todos os nossos casos, impossibilitou o cálculo da taxa de recidiva para esses dois grupos.

Além do método terapêutico, a biologia do tumor e a resposta imune do paciente estão relacionadas à recidiva tumoral⁹⁰. Pacientes imunossuprimidos não somente apresentam tumores mais agressivos, mas apresentam maior recidiva, se comparados a pacientes imunocompetentes^{96,97}.

Ademais, subtipos histológicos influenciam o comportamento biológico do tumor, sendo os casos mais agressivos relacionados a maiores índices de recidiva⁹⁸. Neste estudo, todos os CBCs eram do mesmo subtipo histológico (sólido) e a média de idade dos grupos Estudo e Controle foi

bastante próxima, 67 e 65 anos, respectivamente. Esse dado demonstra que não ocorreu interferência da imunidade relacionada à idade nos resultados aqui apresentados. Além disso, nenhum paciente apresentava deficiência imunológica, nem utilizava medicação imunossupressora.

Na literatura, são citados outros fatores relacionados à falha terapêutica, tais como: localização da neoplasia na zona H da face; lesões com margens mal delimitadas; lesões recidivadas; lesões incompletamente excisadas; e envolvimento perineural e perivascular^{99,100}.

Fatores preditivos para a recidiva do CBC operado pela CMM são: subtipo histológico agressivo, quatro ou mais fases da CMM e defeito cirúrgico final extenso (maior que 40mm)⁹⁶. Para o número de fases na CMM, houve maior proporção de resultados do grupo de Estudo para a fase 4. E, em relação ao tamanho, não se observaram grandes diferenças entre as proporções.

Nesta casuística, dos tumores recidivados, 11 eram sólidos (48%) e dois superficiais (4%), e o restante esclerodermiforme e micronodular (seis e quatro casos, respectivamente).

Smeetz et al.¹⁰¹ estudaram 720 casos de CBC operados na face e apenas 23% dos casos recidivados eram não agressivos. Em estudo semelhante realizado na Holanda¹⁰², 50% dos casos recidivados eram do subtipo histológico não agressivo, mostrando certa proximidade com relação ao resultado aqui apresentado. No nosso estudo, dois casos de CBC sólidos foram excluídos devido à má conservação do bloco de parafina; e dos nove casos restantes do grupo Estudo, três eram tumores recidivados e seis primários. Em relação aos casos do grupo Controle, cinco eram recidivados e 13 primários.

Casos de CBC, com histologia mista, são relatados na literatura e sua incidência varia de 11% a 43%^{90,103}. A maioria dos casos demonstrou continuidade direta entre subtipos histológicos do tumor. Entretanto, alguns com histologia mista apresentam uma faixa normal de derme entre o componente não agressivo e agressivo na derma profunda⁹⁰, podendo

justificar alguns casos recidivados pelo Mohs.

As recidivas dos tumores sólidos, nesta casuística, ocorreram predominantemente na zona H da face, com exceção de apenas um caso (região malar). Os casos do grupo Controle também estavam localizados, em sua maioria, nessa área, exceto por um tumor no tronco e um na região malar, evidenciando a homogeneidade dos grupos em relação à localização anatômica. A região pericavitária e a nasal são as mais propensas à recidiva^{104,105}, provavelmente, pela anatomia, que dificulta o procedimento cirúrgico.

O número médio de fases nos tumores recidivados foi de 2,2 e 1,5 fases, no grupo Controle. Paoli *et al.*¹⁰⁶ estudaram 587 casos de CBC e o número médio de fases para o CBC sólido foi de 2,25 – 2,6 (primário e recidivado, respectivamente).

Os tumores recidivados crescem em uma área cicatricial oriunda de tratamento prévio. Como a cicatriz é pouco irrigada e o tumor necessita de boa vascularização, tende a se expandir sob a área cicatricial, no tecido mais irrigado. Por essa razão, sua tendência é crescer pelos tecidos mais profundos, sendo imperceptível até que apresente extensão para a superfície da pele. Esses dados explicam porque o tumor recidivado tende a apresentar grandes extensões subclínicas, muito além do local visualizado clinicamente, justificando a necessidade de um número maior de fases da CMM para a sua completa remoção⁸.

Além disso, durante o ato cirúrgico, poderia haver a implantação iatrogênica de células tumorais nas regiões perilesionais (pelo descolamento das margens para o fechamento da ferida operatória), ampliando a área de invasão tumoral e justificando, por conseguinte, um aumento do número de fases da CMM necessárias para a sua remoção⁸.

Os pacientes portadores de algum tipo de CBC apresentam maior incidência de novas lesões. Estas ocorrem em 20 a 33% dos casos durante o primeiro ano após o diagnóstico do primeiro CBC. O risco de

desenvolvimento de novos tumores basocelulares atinge 45% nos próximos 3 a 5 anos^{58,107,108}.

Dos pacientes que tiveram recidiva, um apresentou recidiva de duas lesões distintas e um paciente do grupo Estudo apresentou dois tumores cutâneos, justificando a maior chance de os pacientes desenvolverem CBCs secundários^{58, 107,108}.

O tempo médio de recidiva dos casos estudados foi de três anos, sendo que em dois casos a recidiva ocorreu após seis anos de seguimento. Na literatura, os casos de CBC recidivados pela cirurgia de Mohs tendem a ocorrer por volta de três anos, e menos de 4% dos casos recidivam após cinco anos de seguimento^{90,109,110}. Foram relatados casos de recidiva após sete anos⁸⁴.

Alguns trabalhos tentam explicar a recidiva dos tumores tratados pela CMM, já que, teoricamente, 100% das margens são visualizadas. Uma possível justificativa seria a falha técnica na realização das lâminas. Nesses casos, fragmentos da epiderme e derme estariam ausentes e não permitiriam a visualização de todas as margens, deixando, consequentemente, tumor residual no sítio operatório.

A presença de denso infiltrado inflamatório, invasão de células neoplásicas no tecido perineural e a não remoção total da cicatriz durante o procedimento também dificultam a visualização de tumor residual, predispondo a recidiva^{77,111,112}.

A habilidade do cirurgião micrográfico na leitura das lâminas já foi comprovada por meio de estudos comparativos com os dermatopatologistas, resultando em baixos índices de erro diagnóstico^{113,114}.

Mariwalla et al.¹¹³ compararam o diagnóstico de 1.156 lâminas de queratose actínica, CBC e carcinoma espinocelular entre cirurgiões de Mohs e dermatopatologistas e, em apenas 32 casos (2,8%), houve divergência no resultado. Quando foram analisados somente os casos de neoplasias intraepidérmicas, a taxa de concordância foi de 99,7%¹⁰⁴.

Em revisão recente, feita nos casos recidivados do HSPM, todos os casos (13 tumores dos 23 recidivados) que possuíam lâminas da CMM viáveis foram analisados em conjunto com o dermatopatologista e não foi evidenciado nenhum erro de diagnóstico e falha na leitura das lâminas (dados não publicados).

6.2 Análise da prevalência do macrófago M2

1 – Comparação entre os grupos por tipo de célula

O CBC, como outras neoplasias sólidas, é composto por células tumorais e não tumorais, incluindo células estromais (fibroblastos e células endoteliais) e leucócitos, em especial por macrófagos. Esse ambiente é imprescindível para a sua sobrevivência, haja vista que células tumorais transplantadas sem o seu estroma morrem em poucos dias^{115,116,117}.

Casos de CBC incompletamente excisados recidivam em 19,8% a 67% dos casos^{104,118,119}. Nouri *et al.*¹²⁰ observaram que, após o tratamento de CBC com curetagem e eletrocoagulação, havia persistência do tumor em 20% a 40% dos casos; e o acompanhamento, após cinco anos, evidenciou recidiva em apenas 8% a 10% casos. Fatores inflamatórios liberados após a agressão tecidual local poderiam estar relacionados à atividade antitumoral e acabariam por destruir a lesão remanescente.

Hunt *et al.*¹²¹ encontraram evidências histológicas de regressão em 85% dos CBCs, demonstrando aumento significativo do número de linfócitos Th e receptores de IL-2.

Levis *et al.*¹²² propuseram a hipótese de haver uma resposta imune inespecífica, causando descontinuidade entre o tumor e o estroma, o que justificaria a erradicação de 23% dos casos de CBC tratados com aplicação tópica de óleo de cróton, um irritante primário.

Um mecanismo alternativo de destruição das células tumorais remanescentes ocorreria durante o processo de cicatrização da ferida operatória, mais especificamente na fase proliferativa. Nessa fase, miofibroblastos fariam a contratura da cicatriz, reduzindo a superfície cicatricial, estrangulando células do CBC remanescente no local¹²⁰.

Sabe-se que a maioria das células presentes no estroma do tumor corresponde a macrófagos, em especial ao fenótipo M2¹²³, e que essa população celular está presente em maior quantidade nos tipos histológicos mais agressivos de CBC¹². Diante disso, foram selecionados apenas casos de CBC sólido, evitando-se, assim, viés de seleção no estudo.

Na casuística em estudo, não houve relação significativa entre o macrófago M2 nos tumores dos grupos Estudo e Controle, o que contraria a teoria de que existe um microambiente tumoral propício ao crescimento das lesões, caso haja neoplasia remanescente. Talvez o pequeno número de casos justifique esse fato, já que houve um discreto aumento do tipo celular M2 no grupo Estudo.

A análise comparativa do total de macrófagos, representada pelo marcador CD68, também não apresentou resultados significativos entre os grupos. Talvez o MAT, esteja mais relacionado à agressividade do CBC (grau de invasão e destruição tecidual), em detrimento da sua capacidade de recidiva.

No tocante à comparação do subtipo celular M1 ou M2, em relação ao total de macrófagos (CD68), não foi encontrada diferença estatística, entretanto, observou-se discreta prevalência do macrófago M1 no grupo Controle e dos macrófagos M2 no grupo Estudo.

Muitas especulações sobre os sistemas imunológicos específico e inespecífico são feitas em relação à erradicação do tumor residual; no entanto, nenhuma evidência científica esclareceu tal mecanismo. Sabemos que os macrófagos sofrem modificações fenotípicas e funcionais dinâmicas em resposta a sinais específicos do seu ambiente¹²⁴, podendo essa mesma célula sofrer polarização de macrófago M2 para o fenótipo antitumoral (M1)

e vice-versa¹²⁵. Talvez outros fatores estejam envolvidos com a proliferação do tumor remanescente que não o MAT, nem o fenótipo M2, como constatado neste estudo.

Em nossa casuística, a recidiva pode ter ocorrido, devido à falha técnica na realização da CMM, ou algum outro mecanismo imunológico não estudado. Além disso, demonstramos que os casos de CBC recidivados não ocorreram por alteração imunológica com relação aos macrófagos.

6.3 Comparação entre o tamanho e o tempo de evolução dos tumores

Não foi observada diferença estatística entre os tipos de macrófagos de acordo com o tempo de evolução do tumor. Os tumores recentes (abaixo de um ano) e tardios (acima de quatro anos) assemelham-se quanto ao número de macrófagos e seus subtipos populacionais. Acredita-se que o infiltrado tumoral seja composto inicialmente por macrófagos M1¹²⁶ e, com o tempo, ocorra polarização para o fenótipo M2¹²⁷. A causa dessa mudança de polarização é desconhecida, entretanto, áreas de hipóxia no tumor têm sido propostas como uma causa provável de mudança de fenótipo. Demonstrou-se que locais com deficiência de oxigênio de cânceres de endométrio, mama, próstata e ovário apresentam altas concentrações de macrófagos M2¹²⁶.

Na análise dos casos de CBC sólido, de acordo com o tamanho (<1cm; entre 1-2 cm; e > 2 cm), não se observou diferença estatística nas subpopulações de macrófagos. Na literatura, verificou-se que o crescimento dos tumores sólidos não excede 3mm³ devido à hipóxia¹²⁸. Além disso, as células do CBC dobram de tamanho em nove dias¹²⁹, o que pode ser clinicamente observado em cerca de seis meses¹³⁰. Para a manutenção de seu crescimento e sobrevivência em ambiente hostil, os tumores de crescimento

rápido devem suprir a hipóxia e a falta de nutrientes potencializando a neoangiogênese tumoral¹³¹.

Como o CBC sólido tem um crescimento indolente², a divergência na quantidade de macrófagos e seus subtipos não eram esperados, considerando os diferentes tamanhos e o tempo de evolução da doença. O mesmo não era esperado, se comparássemos as formas agressivas com as não agressivas, pois aquelas possuem maior índice mitótico e extensa disseminação, necessitando de mais nutrientes¹² e oxigênio, o que resultaria em uma maior polarização das células M2¹³².

Como existem poucos estudos, em relação ao CBC e o sistema imunológico, sugere-se que novas pesquisas sejam feitas, para que possamos compreender melhor o comportamento dessa doença nos seus diferentes subtipos (tipos histológicos) e nos indivíduos.

7 CONCLUSÃO

Não houve diferença estatística dos fenótipos M1, M2 e MAT nos dois grupos estudados.

Os CBCs sólidos, independentemente do tamanho e do tempo de evolução, possuem as mesmas quantidades e subpopulações de MAT.

REFERÊNCIAS*

1. INCA Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
2. Enokihara MY, Simões MM, Enokihara S. Carcinoma Basocelular e Carcinoma Espinocelular. In: Lupi O, Belo J, Cunha PR, editores. *Rotinas de Diagnóstico e Tratamento da Sociedade Brasileira de Dermatologia*. São Paulo: AC Farmacêutica; 2010. p. 29-35.
3. Miller SJ. Biology of basal cell carcinoma (part 1). *J Am Acad Dermatol*. 1991;24:1-13.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:225-49.
5. Ko CB, Walton S, Keczkes L. Extensive and fatal basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 1992;127:164-7.
6. Sroa N, Campbell S, Ravitskiy. Immunohistochemistry in Mohs Micrographic Surgery. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2009;2(7):37-42.
7. Reis NA, Azevedo LCM, Stolf HO, Nouri K, Kimyai-Asadi A, Goldberg LH. Cirurgia micrográfica de Mohs. *Surg Cosmet Dermatol*. 2011;3(3):227-31.
8. Terzian LR. *Estudo retrospectivo da cirurgia micrográfica de Mohs nos portadores de carcinoma espinocelular cutâneo para a determinação de fatores preditivos do número de fases cirúrgicas, acompanhados no ambulatório de cirurgia dermatológica da Divisão de Dermatologia do HC, da FMUSP/SP*[dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

*De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
 Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP. Elaborado por
 Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S.
 Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e
 Documentação; 2011.
 Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

9. Terzian LR, Nogueira VMA, Paschoal FM. Cirurgia Micrográfica de Mohs para preservação tecidual nas cirurgias oncológicas da face. *Surg Cosmet Dermatol*. 2010;2(4):257-63.
10. Rigel DS, Robins P, Friedman RJ. Predicting recurrence of basal-cell carcinomas treated by microscopically controlled excision: a recurrence index score. *J Dermatol Surg Oncol*. 1981;7(10):807-10.
11. Ro KW, Seo SH, Sang SW, Kim LH. Subclinical infiltration of Basal cell carcinoma in asian patients: assessment after mohs micrographic surgery. *Ann Dermatol*. 2011;23(3):276-81.
12. Tjiu JW, Chen JS, Shun CT, Lin SJ, Liao YH, Chu CY, Tsai TF, Chiu HC, Dai YS, Inoue H, Yang PC, Kuo ML, Jee SH. Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *Invest Dermatol*. 2009 Apr;129(4):1016-25.
13. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42:717-27.
14. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23:549-55.
15. Solinas G, Schiarea S, Liguori M, Fabbri M, Pesce S, Zammataro L, Pasqualini F, Nebuloni M, Chiabrando C, Mantovani A, Allavena P. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):642-52.
16. Galdiero MR, Garlanda C, Jaillon S, Marone G, Mantovani A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. *J Cell Physiol*. 2013 Jul;228(7):1404-12.
17. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2012;65(2):159-63.
18. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutega J, Oberg A, Oldenberg PA, Palmqvist R. The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLOS ONE*. 2012;7(10):e47045.

19. Ly LV, Baghat A, Versluis M, Jordanova ES, Luyten GP, van Rooijen N, van Hall T, van der Velden PA, Jager MJ. In aged mice, outgrowth of intraocular melanoma depends on proangiogenic M2- type macrophages. *J Immunol.*2010; 185:3481-8.
20. Lin X, Zheng W, Liu J, Zhang Y, Qin H, Wu H, Xue B, Lu Y, Shen P. Oxidative stress in malignant melanoma enhances tumor necrosis factor- α secretion of tumor-associated macrophages that promote cancer cell invasion. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Oct 20;19(12):1337-55.
21. Kolk A, Wolff KD, Smeets R, Kesting M, Hein R, Eckert AW. Melanotic and non-melanotic malignancies of the face and external ear – A review of current treatment concepts and future options. *Cancer Treat Rev.*2014 Aug;40(7):819-37.
22. Ozgediz D, Smith EB, Zheng J, et al. Basal cell carcinoma does metastasize. *Dermatol Online J.* 2008;14(8):5.
23. Ko CB, Walton S, Keczkas L. Extensive and fatal basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.*1992;127:164-7.
24. Lo JS, Snow SN, Reizner GT, Mohs FE, Larson PO, Hruza GJ. Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 1991;24:715-9.
25. Margaret McCusker, Nicole Basset-Seguín, Reinhard Dummer, Karl Lewis, Dirk Schadendorf, Aleksandar Sekulic, Jeannie Hou, Lisa Wang, Huibin Yue, Axel Hauschild. Metastatic basal cell carcinoma: Prognosis dependent on anatomic site and spread of disease. *Eur J Cancer.*2014 Mar;50(4):774-83.
26. Nseir A, Esteve E. Basal cell carcinoma. *Presse Med.* 2008;37(10):1466-73.
27. Kyrgidis A, Vahtesevanos K, Tzellos TG, 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(3):276-82.
28. Kasper M, Jaks V, Hohl D, Toftgard R. Basal cell carcinoma – molecular biology and potential new therapies. *J Clin Invest.* 2012;122:455-63.
29. Chinem VP, Miot HA. Epidemiology of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol.* 2011;86:292-305.
30. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2262-9.

31. Brooke RCC. Basal cell carcinoma. *Clin Med*. 2005;5:551-4.
32. Wong CSM, Strange RC, Lear JT. Basal cell carcinoma. *Br Med J*. 2003;327:794-8.
33. Betti R, Crosti C, Moneghini L, Crespi E, Menni S. Axillary basal cell carcinoma: additional 25 patients and considerations. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25:858-60.
34. Liu LS, Colegio OR. Molecularly targeted therapies for nonmelanoma skin cancers. *Int J Dermatol*. 2013 Jun;52(6):654-65.
35. Rahnema F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J*. 2004 Mar 1;378(Pt 2):325-34.
36. Paladini RD, Saleh J, Qian C, et al. Modulation of hair growth with small molecule agonists of the hedgehog signaling pathway. *J Invest Dermatol*. 2005;125:638-46.
37. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*. 2006;2:127-47.
38. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996 Jun 14;85(6):841-51.
39. Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, et al. Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell*. 1992;69:111-7.
40. Aszterbaum M, Rothman A, Johnson RL, et al. Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome. *J Invest Dermatol*. 1998;110:885-8.
41. Reifemberger J, Wolter M, Weber RG, et al. Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res*. 1998;58:1798-1803.
42. Xie J, Murone M, Luoh SM, et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal cell carcinoma. *Nature*. 1998; 391:90-2.
43. Reifemberger J, Wolter M, Knobbe CB, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005;152:43-51.

44. Gailani MR, Stahle-Backdahl M, Leffell DJ, et al. The role of the human homolog of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet.* 1996;14:78-81.
45. Kasper M, Jaks V, Hohl D, Toftgård R. Basal cell carcinoma – molecular biology and potential new therapies. *J Clin Invest.* 2012 Feb 1;122(2):455-63.
46. Wang GY, Wang J, Mancianti ML, Epstein EH Jr. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in Ptch1(+/-) mice. *Cancer Cell.* 2011; 19(1):114-24.
47. McLeod MP, Choudhary S, Alqubaisy YA, Nouri K Basal Cell Carcinoma. In: Nouri K, editor. *Mohs Micrographic Surgery.* Miami: Springer; 2012:177-88.
48. Małgorzata Mackiewicz-Wysocka, Monika Bowszyc-Dmochowska, Daria Strzelecka-Węklar, Aleksandra Dańczak-Pazdrowska, Zygmunt Adamski. Basal cell carcinoma – diagnosis. *Contemp Oncol (Pozn).* 2013;17(4):337-42.
49. Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. Tumors of the surface epithelium. In: *McKee's Pathology of the skin with clinical correlations.* 4th ed. Elsevier Saunders; 2012.v. 2. p. 1076-149.
50. Kirkham N. Tumores e cistos da epiderme. In: Elder DE. *Lever Histopatologia da pele.* 10a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 782-93.
51. Lever WF, Schaumburg-Lever G. Histopathology of the skin. 7th ed. J.B. Lippincott Company; 1990.
52. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, et al. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. part 1: overview. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991;17:713-8.
53. Silverman MK, Kopf AW. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas [letter]. *J Dermatol Surg Oncol.* 1993;19:76.
54. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL Jr. Long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol.* 1989;15:315-28.
55. Bath-Hextall F, Bong J, Perkins W, Williams H. Interventions for basal cell carcinoma of the skin: systematic review. *BMJ.* 2004;329:705.
56. Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, Tollefson MM, et al. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA.* 2005 Aug 10;294(6):681-90.

57. Blixt E, Nelsen D, Stratman E. Recurrence rates of aggressive histologic types of basal cell carcinoma after treatment with electrodesiccation and curettage alone. *Dermatol Surg*.2013 May;39(5):719-25.
58. Robinson JK. Risk of developing another basal cell carcinoma. A 5-year prospective study. *Cancer*. 1987;60:118-20.
59. Goldman G. The current status of curettage and electrodesiccation. *Dermatol Clin*. 2002;20:569-78.
60. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, et al. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. part 2: curettage-electrodesiccation. *J Dermatol Surg Oncol*. 1991;17:720-6.
61. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, et al. Measuring lesion diameters [response to letter]. *J Dermatol Surg Oncol*. 1992;18:249-53.
62. Telfer NR, Colver GB, Morton CA. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*.2008;159:35-48.
63. Kuijpers DI, Thissen MR, Neumann MH. Basal cell carcinoma: treatment options and prognosis, a scientific approach to a common malignancy. *Am J Clin Dermatol*. 2002;3:247-59.
64. Berking C, Hauschild A, Kölbl O, Mast G, Gutzmer R. Basal cell carcinoma – treatments for the commonest skin cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2014 May 30;111(22):389-95.
65. Dubas LE, Ingraffea A. Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2013 Feb;21(1):43-53.
66. Roozeboom MH, Arits AH, Nelemans PJ, Kelleners-Smeets NW: Overall treatment success after treatment of primary superficial basal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials. *Br J Dermatol*. 2012;167:733-56.
67. Rigel DS, Cockerell CJ, Carucci J, Wharton J. Actinic keratosis, basal caell carcinoma and squamous cell carcinoma. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RR. *Dermatology*. 2a ed. Spain:Elsevier; 2008. p.1641-60.
68. Tierney EP, Hanke CW. Cost effectiveness of Mohs micrographic surgery: review of the literature. *J Drugs Dermatol*. 2009;8(10):914-22.
69. Rogers HW, Coldiron BM. A relative value unit- based cost comparison of treatment modalities for nonmelanoma skin cancer: effect of the loss of the

Mohs multiple surgery reduction exemption. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61(1):96-103.

70. Berrada et al. Vismodegib: the Proof of Concept in Basal Cell Carcinoma. *Clin Med Insights Oncol*. 2014 Jun 2;8:77-80.

71. Mohs F. Chemosurgery: a microscopically controlled method of cancer excision. *Arch Surg*. 1941;42:279-95.

72. Mohs FE. Cancer of the eyelids. *Bull Am Coll Chemosurg*. 1970;3:10-1.

73. Tromovitch TA, Stegman SJ. Microscopic-controlled Excision of skin tumors: chemosurgery (Mohs): fresh tissue technique. *Arch Dermatol*. 1974; 11:231-2.

74. Ratner D, Bagielle E. The efficacy of curettage in delineating margins of basal cell carcinoma before Mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg*. 2003;29(9):899-903.

75. Chung VQ, Bernardo L, Jiang SB. Presurgical curettage appropriately reduces the number of Mohs stages by better delineating the subclinical extensions of tumor margins. *Dermatol Surg*. 2005;31(9 Pt 1):1094-9 [discussion: 1100].

76. Zachary CB, Rest EB, Furlong SM, et al. Rapid cyto- keratin stains enhance the sensitivity of Mohs micrographic surgery for squamous cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol*. 1994;20:509-10.

77. Rapini RP. Basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma in Mohs sections. In: Gross KG, Steinmann HK, Rapini RP, editors. *Mohs surgery fundamentals and techniques*. St Louis (MO): Mosby; 1999. p. 161-91.

78. Velasquez EF, Murphy GF. Histologia da pele. In: Elder DE. *Lever: Histopatologia da pele*. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011. p. 39-40.

79. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357:539-45.

80. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*. 2005;7:211-7.

81. Ladusch M, Schaffner H, Ullmann L, Littmann M, Reimann S, Gindl P, Ambrosius H. Pre- and postoperative reactivity of breast cancer patients to tumor associated antigens and HEP in the macrophage electrophoresis mobility (MEM) test. *Arch Geschwulstforsch*. 1982;52:469-78.

82. Neumeister B, Hambsch K, Storch H. Macrophage adherence inhibition test (MAI) in Wistar rats bearing Jensen tumors. I. MAI after incubation with tumor-associated antigens. *Arch Geschwulstforsch.* 1983;53:521-8.
83. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:540-50.
84. Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemo attractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:149-54.
85. Lin EY1, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 2001;193:727-40.
86. Duyndam MC, Hilhorst MC, Schluper HM, et al. Vascular endothelial growth factor-165 overexpression stimulates angiogenesis and induces cyst formation and macrophage infiltration in human ovarian cancer xenografts. *Am J Pathol.* 2002;160:537-48.
87. Nowicki A, Szenajch J, Ostrowska G, et al. Impaired tumor growth in colony-stimulating factor 1 (CSF-1)-deficient, macrophage-deficient op/op mouse: evidence for a role of CSF-1-dependent macrophages in formation of tumor stroma. *Int J Cancer.* 1996;65:112-9.
88. Aharinejad S, Abraham D, Paulus P, et al. Colony-stimulating factor-1 antisense treatment suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *Cancer Res.* 2002;62:5317-24.
89. Solinas G, Schiarea S, Liguori M, Fabbri M, Pesce S, Zammataro L, Pasqualini F, Nebuloni M, Chiabrando C, Mantovani A, Allavena P. Tumor-conditioned macrophages secrete migration-stimulating factor: a new marker for M2-polarization, influencing tumor cell motility. *J Immunol.* 2010 Jul 1;185(1):642-52.
90. Cohen PR, Schulze KE, Nelson BR. Basal cell carcinoma with mixed histology: a possible pathogenesis for recurrent skin cancer. *Dermatol Surg.* 2006 Apr;32(4):542-51.
91. Rowe DE, Carroll RJ, Day CI, Jr. long-term recurrence rates in previously untreated (primary) basal cell carcinoma: implications for patient follow-up. *J Dermatol Surg Oncol.* 1989;15:315-28.
92. Rowe DE, Carroll RJ, Day CI, Jr. Mohs surgery is the treatment of choice for recurrent (previously treated) basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol.* 1989;15:424-31.
93. Julian CG, Bowers PW. A prospective study of Mohs' micrographic

surgery in two English centres. *Br J Dermatol*. 1997;136:515-18.

94. Smeets NW, Kuijpers DI, Nelemans P, Ostertag JU, Verhaegh ME, Krekels GA, et al. Mohs' micrographic surgery for treatment of basal cell carcinoma of the face – results of a retrospective study and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2004;151:141-7.

95. Paoli J, Daryoni S, Wennberg AM, Mölne L, Gillstedt M, Miocic M, Stenquist B. 5-year Recurrence Rates of Mohs Micrographic Surgery for Aggressive and Recurrent Facial Basal Cell Carcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2011 Oct;91(6):689-93.

96. Oram Y, Orenko I, GRIego RD, Rosen T, Thornby J. Histologic patterns of basal cell carcinoma based upon patient immunostatus. *Dermatol Surg*. 1995; 21:611-4.

97. Mehrany K, Weenig RH, Pittelkow MR, Roenigk RK, Otley CC. High recurrence rates of basal cell carcinoma after Mohs surgery in patients with chronic lymphocytic-leukemia. *Arch Dermatol*. 2004;140:985-8.

98. Dixon AY, Lee SH, McGregor DH. Factors predictive of recurrence of basal cell carcinoma. *Am J Dermatol*. 1989;11:222-32.

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

100. Drake LA, Dinehart SM, Goltz RW, Graham GF, Hordinsky MK, Lewis CW, Pariser DM, Salasche SJ, Skouge JW, Turner ML, et al. Guidelines of care for Mohs micrographic surgery. *J Am Acad Dermatol*. 1995 Aug;33(2 Pt 1):271-8.

101. Smeets NW, Kuijpers DI, Nelemans P, Ostertag JU, Verhaegh ME, Krekels GA, et al. Mohs' micrographic surgery for treatment of basal cell carcinoma of the face – results of a retrospective study and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2004;151:141-7.

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

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

104. 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.

105. Silverman MK, Kopf AW, Grin CM, Bart RS, Levenstein MJ. Recurrence rates of treated basal cell carcinomas. Part 1: Overview. *J Dermatol Surg Oncol.* 1991;17:713-8.

106. Paoli J, Daryoni S, Wennberg AM, Mölne L, Gillstedt M, Miocic M, Stenquist B. 5-year Recurrence Rates of Mohs Micrographic Surgery for Aggressive and Recurrent Facial Basal Cell Carcinoma. *Acta Derm Venereol.* 2011 Oct;91(6):689-93.

107. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol.* 2000;136:1524-30.

108. Marghoob A, Kopf AW, Bart RS, Sanfilippo L, et al. Risk of another basal cell carcinoma developing after treatment of a basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 1993;28:22-8.

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

110. Leibovitch I, Huilgol SC, Selva D, Richards S, Paver R. Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia II. Outcome at 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:452-57.

111. Eliezri YD, Cohen PR. Cancer recurrence following Mohs micrographic surgery: a mechanism of tumor persistence. *Plast Reconstr Surg.* 1992 Jul;90(1):121-5.

112. Dzubow LM. False-negative tumor-free margins following Mohs surgery. *J Dermatol Surg Oncol.* 1988;14:600-2.

113. Mariwalla K, Aasi SZ, Glusac EJ, Leffell DJ. Mohs micrographic surgery histopathology concordance. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Jan;60(1):94-8.

114. Semkova K, Mallipeddi R, Robson A, Palamaras I. Mohs Micrographic Surgery Concordance Between Mohs Surgeons and Dermatopathologists. *Dermatol Surg.* 2013 Nov;39(11):1648-52.

115. Gernstein W. Transplantation of basal cell epithelioma in rabbit. *Arch Dermatol.* 1963 Dec;88:834-6.

116. Lyles TW, Freeman RG, Know JM. Transplantation of basal cell epitheliomas. *J Invest Dermatol.* 1960;34:205-35.

117. Pawowiski A, Haberman HF. Hetero transplantation of human basal cell carcinomas in nude mice. *J Invest Dermatol.* 1979;72:310.

118. Staub G, Revol M, May P, Bayol JC, Verola O, Servant JM. Excision skin margin and recurrence rate of skin cancer: a prospective study of 844 cases. *Ann Chir Plast Esthet.* 2008;53:389-98.
119. Rosso S, Zanetti R, Martinez C, Tormo MJ, Schraub S, Sancho-Garnier H, et al. The multicentre south European study 'Helios'. II: Different sun exposure patterns in the aetiology of basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer.* 1996;73:1447-54.
120. Nouri K et al. Does wound healing contribute to eradication of basal cell carcinoma following curettage and electrodessication? *Dermatol Surg.* 1999;25(3):183-88.
121. Hunt MJ, Halliday CM, Weedon D, et al. Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol.* 1994;130:1-8.
122. Levis WR, Kraemer KH, Klingler WC, et al. Topical immunotherapy of basal cell carcinoma with dinitrochlorobenzene. *Cancer Res.* 1973 Nov;33(11):3036-42.
123. Singh A, Talekar M, Raikar A, Amiji M. Macrophage-targeted delivery systems for nucleic acid therapy of inflammatory diseases. *J Control Release.* 2014 Sep 28;190:515-30.
124. Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014 Feb;26(2):192-7.
125. He M, Xu Z, Ding T, Kuang DM, Zheng L. MicroRNA-155 regulates inflammatory cytokine production in tumor-associated macrophages via targeting C/EBPbeta. *Cell Mol Immunol.* 2009 Oct;6(5):343-52.
126. Tripathi C, Tewari BN, Kanchan RK, Baghel KS, Nautiyal N, Shrivastava R, Kaur H, Bhatt ML, Bhadauria S. Macrophages are recruited to hypoxic tumor areas and acquire a Pro-Angiogenic M2-Polarized phenotype via hypoxic cancer cell derived cytokines Oncostatin M and Eotaxin. *Oncotarget.* 2014 Jul 30;5(14):5350-68.
127. Biswas SK, Sica A, and Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J. Immunol.* 2008;180:2011-7.
128. Lewis CE, Leek R, Harris A, and McGee JO. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *J Leukoc Biol.* 1995;57:747-51.
129. Weinstein CD, Frost P. Cell proliferation in human basal cell carcinoma.

Cancer Res. 1970;30:724-8.

130. Shanoff L, Spira M, Hardy S. Basal cell carcinoma: a statistical approach to rational management. *Plast Reconstr Surg.* 1967;39:619-24.

131. Park JE ,Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze S K. Hypoxic Tumor Cell Modulates Its Microenvironment to Enhance Angiogenic and Metastatic Potential by Secretion of Proteins and Exosomes.*Mol Cell Proteomics.* 2010;9(6):1085-99.

132. Tripathi C, Tewari BN, Kanchan RK, Baghel KS, Nautiyal N, Shrivastava R, Kaur H, Bhatt ML, Bhadauria S. Macrophages are recruited to hypoxic tumor areas and acquire a Pro-Angiogenic M2-Polarized phenotype via hypoxic cancer cell derived cytokines Oncostatin M and Eotaxin. *Oncotarget.*2014 Jul 30;5(14):5350-68.