Nádia Barbosa Aires

**Triquilemocarcinoma e triquilemoma: estudo comparativo clínico,
histopatológico e imunoistoquímico**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Dermatologia

Orientador: Dr. Cyro Festa Neto

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Aires, Nádia Barbosa

Triquilemocarcinoma e triquilemoma : estudo comparativo clínico, histopatológico e imunoistoquímico / Nádia Barbosa Aires. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.

Orientador: Cyro Festa Neto.

Descritores: 1.Neoplasias cutâneas 2.Imunoistoquímica 3.Neoplasias de anexos e apêndices cutâneos 4.Folículo piloso 5.Epidemiologia

USP/FM/DBD-016/12

Dedico este trabalho aos meus pais, Ruy e Esperança, pelos exemplos de superação e dedicação incondicional. Ao meu marido, Fábio, pelo amor, companheirismo e apoio para seguir em frente. Às minhas filhas, Amanda e Micaela, que são meu grande projeto de vida, o novo sentido da minha vida.

Dedico o meu esforço a toda a minha família e aos meus amigos por toda a sua ajuda e amizade nos períodos difíceis dessa jornada e pela confiança no meu sucesso.

Agradecimentos

Ao Dr Cyro, meu orientador, pela paciência e confiança que tornaram possível a realização deste trabalho. Agradeço o incentivo constante e a oportunidade de compartilhar o desafio de estudar um tumor raro.

À Dra Mirian, por todos os ensinamentos, pelo apoio e colaboração em todas as fases deste estudo. Obrigada por ter me possibilitado aprender com o seu trabalho e depositado confiança neste estudo.

Ao Dr Eugênio Pimentel pelos ensinamentos cirúrgicos em dermatologia e por colaborar cedendo fotos clínicas para a ilustração deste trabalho.

À bióloga Fernanda pela grande ajuda e orientação na realização dos estudos imunoistoquímicos no LIM-56 do IMT.

Às técnicas do Laboratório de Histologia pelo auxílio na confecção das lâminas e colorações necessárias ao sucesso do trabalho.

Ao Laboratório do Dr Venâncio pelo auxílio na realização dos estudos imunoistoquímicos.

Ao Departamento de Patologia do Hospital AC Camargo, São Paulo, pela realização do TMA.

À sra Eli Maria pela ajuda nos assuntos burocráticos.

A todos os amigos da Dermatologia pelo apoio, incentivo e auxílio nas muitas dificuldades.

Esta dissertação ou tese 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

Resumo

Summary

1. Introdução	1
1.1. Epidemiologia do Câncer de Pele	2
1.2. Tumores de Anexo	4
1.3. O folículo piloso	6
1.4. Triquilemoma	10
1.5. Triquilemocarcinoma	11
1.6. Diagnóstico diferencial	14
1.7. Estudos imunoistoquímicos	16
1.8. Tratamento	24
1.9. Prognóstico	25
 2. Objetivos	 26
 3. Casuística e métodos	 28
3.1. Informações gerais	29
3.2. Critérios da Seleção de pacientes	29
3.3. Sequência de estudo	29
3.4. Técnica para preparo das lâminas	30
3.5. Técnica imunoistoquímica para CK16 e Claudinas.....	33
3.6. Técnica imunoistoquímica para CD34	35
3.7. Técnica imunoistoquímica para Ki67 e p63	37
3.8. Escaneamento e leitura das lâminas	38
3.6. Análise Estatística	40

4. Resultados	42
5.1. Triquilemoma	43
5.2. Triquilemocarcinoma	56
5.3. Comparativos	67
5. Discussão	84
6. Conclusão	91
8. Referências Bibliográficas.....	93

RESUMO

Aires NB. Triquilemocarcinoma e triquilemoma: um estudo comparativo clínico, histopatológico e imunoistoquímico [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Vários estudos têm relatado um aumento da incidência de câncer de pele em todo o mundo. No Brasil, o câncer de pele em geral continua sendo a neoplasia mais incidente em ambos os gêneros. Os tumores de anexos cutâneos compõem um grupo grande de neoplasias que exibem diferenciação morfológica para um dos epitélios anexiais da pele normal. Este trabalho trata dos aspectos clínicos, histológicos e imunoistoquímicos de um tumor anexial de origem folicular: o triquilemocarcinoma e sua versão benigna o triquilemoma. Os objetivos foram analisar comparativamente os dados clínicos, epidemiológicos e a expressão de citoqueratinas 15 e 16, claudinas 1,3,4,5,7 e 11, antígeno CD34, do p63 e do índice de proliferação celular pelo Ki67 entre o grupo dos Triquilemomas e Triquilemocarcinomas diagnosticados na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo no período de 1991 a 2009 e definir um padrão imunofenotípico que auxilie no diagnóstico diferencial dos dois tumores. O estudo foi feito através de revisão clínico-epidemiológica de prontuário dos casos diagnosticados no período de 1991 a 2009; revisão das lâminas em HE e PAS com e sem diastase; realização das técnicas de imunoistoquímica. No período de 18 anos foram identificados 22 casos válidos de triquilemoma e 16 casos válidos de triquilemocarcinoma. Observou-se uma maior incidência de Triquilemoma entre adultos masculinos enquanto que os Triquilemocarcinomas predominaram entre os idosos femininos. A cabeça foi mais acometida entre os casos benignos que entre os malignos. A opção terapêutica predominante entre os triquilemomas foi de eletrocoagulação e de excisão cirúrgica para os demais casos. A claudina-1, claudina-4 e o CD34 apresentavam medianas mais altas nos casos benignos que nos malignos. Portanto, conclui-se que os dados epidemiológicos e clínicos dos dois grupos de tumores se distinguem em relação à idade, gênero, local de acometimento e tipo de tratamento; observou-se perda de expressão das CL1 e 4 e do CD34, marcadores de diferenciação celular, nos Triquilemocarcinomas em comparação aos Triquilemomas. Por outro lado, o índice de proliferação celular pelo Ki67 mostrou-se um marcador inútil para a distinção entre as formas benigna e maligna.

Descritores: neoplasias cutâneas, imunoistoquímica, Neoplasias de Anexos e de Apêndices Cutâneos, Folículo Piloso, Epidemiologia.

ABSTRACT

Aires NB. Trichilemal carcinoma and trichilemmoma: a clinical, histopathological and immunochemical comparative study [dissertation] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Several studies have been reporting an increasing incidence in skin cancers all over the world. In Brazil, skin cancers are the most prevalent neoplasia in both genders. The skin adnexal tumors are a large group of neoplasias that differentiate into normal skin adnexal epithelium. We report here the clinical, histopathological and immunochemical aspects of the tumors of follicular origin: the trichilemmal carcinoma and its benign variation - trichilemmoma. The objectives were to analyse comparatively the clinical and histological data and to compare the expression of the cytokeratins 15 and 16, claudins 1,3,4,5,7 and 11, antigen CD34, p63 and the cell proliferation index in the Ki67 between the two groups, defining a immunophenotypic pattern that could help the differential diagnosis of the two tumors. The study was made by identifying in the hospital records the cases of these tumors between 1991 and 2009. After that, a clinico-epidemiological review was made in the medical records, the histological samples were reviewed to confirm the diagnosis. The best areas were selected to compose the Tissue MicroArray that was used to immunochemical reactions. In these 18 years, there were 22 valid cases of trichilemmoma and 16 of trichilemmal carcinoma. There was a higher incidence of trichilemmoma in male adults and of trichilemmal carcinoma in female elderly. The head was more affected in the benign tumors than in the malignant ones. The treatment option was electrodissection in Trichilemmomas and surgical excision in Trichilemmal carcinomas. Claudin-1, claudin-4 and CD34 were more expressed in the first group. So, we concluded that the clinical and epidemiological data in the two groups differ in age, gender, local of the tumor and treatment option. There was loss of expression of CL1 and 4 and of CD34, cell differentiation markers, in the Trichilemmal carcinoma when compared to the Trichilemmomas. On the other hand, the Ki67 expression was of no use in differentiating the two groups of tumor.

Descriptors: skin neoplasia; immunochemistry; Neoplasms, Adnexal and Skin Appendage, Hair follicle, Epidemiology.

1 Introdução

1.1. Epidemiologia do Câncer de Pele

Vários estudos têm relatado um aumento da incidência de câncer de pele em todo o mundo. Essa tendência pode ser atribuída à maior exposição da pele à radiação ultravioleta causada pelo aumento da expectativa de vida, aumento das atividades de lazer ao ar livre, maior informação pública sobre o câncer de pele levando ao maior diagnóstico. (Jin, 2005)

No Brasil, o câncer de pele em geral continua sendo a neoplasia mais incidente em ambos os gêneros. Sua letalidade é considerada baixa. Porém, se houver demora no diagnóstico, pode levar a deformidades físicas graves com conseqüente deterioração da qualidade de vida. Pode ter taxas altas de cura completa, se tratada de forma adequada e oportuna. Devido à subnotificação, as estimativas das taxas de incidência em relação a este tipo de câncer devem ser consideradas como estimativas mínimas. (Inca, 2010)

Os tumores de pele podem ser classificados em: melanoma e não-melanoma. Entre os cânceres de pele, o melanoma representa 4-7% do total. Os tumores não-melanoma correspondem a 93-96% das neoplasias cutâneas. (Guerrissi e Quiroga, 2008)

Entre os últimos, incluem-se os carcinomas basocelulares (CBC), espinocelulares (CEC), tumores de anexo cutâneo (CAC), tumores vasculares, de origem no subcutâneo e mesenquimais. (Guerrissi e Quiroga, 2008) Os mais frequentes são CBC, responsável por 70% dos diagnósticos, e o CEC, representando 25% dos casos. (Inca 2010) (Figura 1) Os TAC, tanto benignos

quanto malignos correspondem a apenas cerca de 1-2 % do total. (Guerrissi e Quiroga, 2008).

Figura 1. Prevalência dos tipos de câncer de pele não melanoma, segundo dados da Estimativa 2010: Incidência do Câncer no Brasil, do Instituto do Câncer, RJ.

O tipo não melanoma é o câncer mais freqüente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. Apresenta altos percentuais de cura, se for detectado precocemente. Entre os tumores de pele, o tipo não-melanoma é o de maior incidência e mais baixa mortalidade. (Inca, 2010)

O número de casos novos de câncer de pele do tipo não-melanoma estimados para o Brasil no ano de 2010 é de 53.410 entre homens e de 60.440

nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 56 casos novos a cada 100 mil homens e 61 para cada 100 mil mulheres. (Inca, 2010).

O câncer de pele não-melanoma é o mais incidente em homens na maioria das regiões do Brasil, inclusive na região sudeste, com um risco estimado de 53/100.000. Nas mulheres é o segundo mais freqüente na Região Sudeste (56/100.000). (Inca ,2010)

1.2. Tumores de Anexo Cutâneo

Os tumores não melanoma podem se originar das diversas estruturas que compõem a pele. Os tumores de anexos cutâneos compõem um grupo grande e variado de neoplasias benignas e malignas que exibem diferenciação morfológica para um dos epitélios anexiais presentes na pele normal. (Cotton 1991, Alsaad 2007).

Os anexos cutâneos são derivados da ectoderme e se desenvolvem a partir da vida embrionária. Durante a quarta semana de desenvolvimento, a ectoderme e a mesoderme subjacente começam a proliferar e a se diferenciar em direção a várias estruturas, incluindo os anexos. Essas estruturas cutâneas especializadas estão localizadas na derme e em alguns pontos do tecido celular subcutâneo. Elas são representadas por estruturas histologicamente distintas: (1) a unidade pilossebácea; (2) a glândula sudorípara écrina; e (3) a glândula sudorípara apócrina. A distribuição desses anexos varia conforme a porção da pele em que se encontram, mas a morfogênese geral é a mesma. (Alsaad 2007)

A maioria dos tumores de anexo é benigna, de forma que a excisão cirúrgica completa é curativa. A variante maligna de quase todos os tumores de anexo já foi descrita. Esses tumores malignos são raros na prática clínica, localmente agressivos e tem potencial para envolvimento nodal e metástase à distância, com um prognóstico ruim. (Alsaad 2007)

Entretanto, o diagnóstico de alguns desses tumores anexiais benignos tem implicações importantes, pois podem ser marcadores de síndromes associadas a neoplasias malignas internas como a síndrome de Muir-Torre com os tumores sebáceos e a doença de Cowden com os triquilemomas. (Alsaad 2007)

Este trabalho trata dos aspectos clínicos, histológicos e imunoistoquímicos de um tipo específico de tumor anexial de origem folicular: o triquilemocarcinoma e sua versão benigna o triquilemoma. Para compreender melhor os tumores de origem no pêlo, é preciso entender a anatomia do folículo.

1.3. O folículo piloso

O folículo piloso é uma invaginação tubular da epiderme, (Figura 2) responsável pela formação do pêlo, uma estrutura altamente modificada e queratinizada. Uma papila muito vascularizada se localiza numa expansão bulbosa (o bulbo piloso) que está localizada na derme reticular ou no tecido celular subcutâneo superficial. (Alsaad 2007)

Figura 2. Esquema da anatomia do folículo piloso. Retirado de www.naturale.med.br

Cada fio de cabelo consiste de uma medula mais interna, recoberta por uma camada cortical larga e queratinizada e uma camada fina mais externa de queratina, a cutícula. (Alsaad 2007) (Figura 3)

Figura 3. Figura demonstrando composição do pêlo propriamente dito. Adaptada de imagem do site www.jcpereira.com.br

O folículo compreende as seguintes porções (figura 4): o acrotríquio, que é a porção intraepidérmica do folículo; o infundíbulo, situado entre o óstio e o ponto de inserção da glândula sebácea; o istmo, entre a abertura da glândula sebácea no folículo e o ponto de inserção do músculo eretor do pêlo; e o segmento inferior, que é a porção restante, situada abaixo do músculo eretor. (Sampaio e Rivitti 2007)

Figura 4. Segmentos do folículo piloso. Imagem adaptada do site www.esteticaspt.blogspot.com

Nessa porção inferior encontra-se o bulbo piloso que contém a matriz do pêlo. As células da matriz são capazes de produzir seis linhagens diferentes, as três camadas da bainha radicular interna e as três camadas da bainha radicular externa ou do pêlo propriamente dito (Figura 5). A bainha radicular interna compreende a cutícula, a camada de Huxley e a camada de Henle. A bainha radicular externa alonga-se desde a epiderme até as porções laterais do bulbo piloso e consiste de células claras, ricas em glicogênio que se separam da derme por uma membrana espessa composta de tecido fibroso homogeneizado. (Alsaad 2007).

Figura 5. Camadas do folículo piloso. Figura extraída do site www.libremundo.com.ar

Tumores podem se originar de diversas porções do folículo. Entre as entidades de diferenciação a partir da bainha externa folicular, estão: triquilemoma (TM) e triquilemocarcinoma (TC). O triquilemoma é um tumor benigno caracterizado por proliferação lobular de células basalóides ricas em glicogênio, enquanto o TC é um carcinoma invasivo. Há relato de possibilidade de TC *in situ* (Sasaki 1998). OS tumores originados desta região apresentam queratinização triquilemal, caracterizada por camada granulosa ausente ou mínima, queratinização abrupta celular e formação de queratina não lamelar densa. (Garret 2004)

1.4. Triquilemoma (TM)

Triquilemomas são tumores benignos que surgem como uma proliferação folículo-infundibular a partir da bainha externa do folículo piloso. (Alsaad 2007)

O TM geralmente ocorre como lesão solitária, freqüentemente na face de adultos mais velhos, particularmente sobre o nariz. Afeta ambos os sexos igualmente. (Alsaad 2007). Ele geralmente se apresenta como pápula cor da pele, isolada ou como lesão verrucosa. (Figura 9) (Alsaad 2007). Embora de histogênese ainda desconhecida (Kurokawa 2003, Cotton 1991), tem sido sugerida uma correlação entre a infecção pelo HPV (human papillomavirus) e o desenvolvimento desses tumores baseado em observações morfológicas. Há estudos que tentam demonstrar a presença em TM, mas os resultados são divergentes. Stierman et al e Leonardi et al não identificaram presença de HPV em amostras de TM. (Leonardi 1991; Stierman 2010) Por outro lado, Rohwedder et al identificaram por PCR (Polymerase Chain Reaction) a presença de DNA de HPV nas amostras de TM. (Rohwedder 1997)

Triquilemomas múltiplos ocorrem caracteristicamente em associação com a síndrome de Cowden (Síndrome de múltiplos hamartomas). Essa genodermatose é uma desordem autossômica dominante, caracterizada por múltiplos hamartomas na pele, mama, tireóide, trato gastrointestinal, endométrio e cérebro, e está associada com risco significativamente aumentado de neoplasias malignas nesses órgãos. (Alsaad 2007, Cotton 1991)

Histologicamente, o triquilemoma é uma proliferação celular bem delimitada, simétrica, com lóbulos de células claras, com citoplasma rico em

glicogênio fazendo uma ampla conexão com a epiderme, que é hiperplasiada (Figura 11). Os ninhos tumorais são uniformes, demonstram uma membrana basal espessada (Figura 12) e paliçada periférica (Figura 13) e. A coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) é positiva e sensível à diastase. (Kurokawa 2003, Alsaad 2007). (Figura 15)

O TM desmoplásico é uma variante histológica caracterizada pela presença de células tumorais, envoltas em derme densa, hipocelular e fibrótica, semelhante ao CBC desmoplásico e ao CEC desmoplásico. A presença de características do TM convencional na periferia de uma lesão desmoplásica, presença de material PAS-positivo e sensível a diastase nos blocos epiteliais e a expressão imunohistoquímica de CD34 são características importantes que favorecem o diagnóstico de TM desmoplásico. (Alsaad 2007)

1.5.Triquilemocarcinoma (TC)

Triquilemocarcinoma é um tumor anexial incomum (Lai 2003, Billingsley 1997, Song 2000, Ko 1996). Acredita-se que se trate de apresentação maligna do TM (Reis 1993, Kurokawa 2006, Allee 2003, Garret 2003, Wong 1994).

Em 1976, Headington propôs inicialmente o termo triquilemocarcinoma para uma neoplasia de queratinócitos anexiais, invasivo, com atipia citológica, mantendo continuidade com a epiderme e/ou epitélio folicular (Jo 2005, Laochumroonvorapong 2002, Garret 2004, Monteagudo 1999).

O TC afeta indivíduos idosos (Billingsley 1997, Garret 2003, Chan 1999, Nakatani 1998, Oyama 2008). Não há predisposição por gênero (Garret 2004,

Billingsley 1997, Crowson 2006, Oyama 2008). Há relato de apenas um caso ocorrendo em paciente de fototipo VI (Laochumroonvorapong 2002). Nos demais, quando o fototipo é citado, trata-se de paciente caucasiano ou asiático (Laochumroonvorapong 2002). Ocorre preferencialmente em áreas fotoexpostas (Jo 2005, Song 2000, Chan 1999), principalmente em cabeça e pescoço (Figura 16 e 17), mas pode acometer também as extremidades, como dorso das mãos. (Laochumroonvorapong 2002, Allee 2003, Crowson 2006, Ikeda 2000). Menos freqüentemente, aparece como lesões múltiplas em áreas não fotoexpostas. (Garret 2003, Chan 1999) Manifesta-se como nódulo único, superficial, de menos de 2 cm, podendo haver ulceração ou superfície queratósica (Garret 2004, Lai 2003, Billingsley 1997, Song 2000). Clinicamente, não há um aspecto característico (Laochumroonvorapong 2002, Reis 1993) (Figura 9) e a distribuição está demonstrada na figura 10. Costuma ter menos de 1 ano de evolução ao diagnóstico, tendo uma fase recente de crescimento rápido. (Billingsley 1997)

A patogênese do TC permanece desconhecida (Laochumroonvorapong 2002, Kurokawa 2006). Entretanto, tem-se considerado o dano actínico (Laochumroonvorapong 2002, Lai 2003, Ko 1996), a radiação crônica em baixas doses (Lai 2003), queimaduras (Ko 1996, Ikeda 2000) e a presença de triquilemoma benigno prévio (Lai 2003, Wong 1994) como fatores predisponentes. Lesão actínica na pele adjacente é achado comum e favorece a correlação etiopatogênica (Oyama 2008). Entretanto, como o triquilemocarcinoma é um tumor anexial, a distribuição das lesões pode ser relacionada apenas à sua origem, favorecendo a cabeça e pescoço (Laochumroonvorapong 2002). Há relatos de 05 casos de triquilemocarcinomas surgindo a partir de lesões de queratoses seborréicas (QS).

Curiosamente, todos os casos ocorreram em japoneses, em áreas não fotoexpostas. No entanto não se sabe se o TC pode derivar da QS ou se representa apenas uma coincidência (Oyama 2008).

Ao contrário do observado com o TM, o TC não tem sido relacionado com a síndrome de Cowden, uma genodermatose associada com múltiplos triquilemomas. (Billingsley 1997, Crowson 2006).

Histologicamente, o triquilemocarcinoma consiste de lóbulos epiteliais invasivos (Figura 19), com paliçada periférica, cujas células claras, ricas em glicogênio e com atipia (Figura 20) demonstram continuidade com a epiderme adjacente e epitélio folicular (Figura 21)(Ko 1996, Reis 1993, Alee 2003, Wong 1994). A queratinização é triquilemal (Garret 2004). É caracterizado pela atipia citológica, padrão de crescimento invasivo (figura 22), atividade mitótica intensa e focos de queratinização tipo triquilemal. (Garret 2004, Reis 1993, Wong 1994) As células têm coloração PAS positiva, sensível à diastase e são negativas para mucina (Garret 2004). (Figura 23)

1.6. Diagnóstico Diferencial

1.6.1. Triquilemoma

O TM deve ser diferenciado de queratose folicular invertida, carcinoma basocelular de células claras e hidroacantoma simplex.

A queratose folicular invertida é uma expansão epitelial escamosa e basalóide da porção infundibular do folículo piloso. É semelhante à queratose seborréica irritada endofítica. Não apresenta paliçada periférica, nem membrana basal espessada. Contém cistos de queratina que auxiliam na diferenciação.

O Carcinoma Basocelular de células claras não tem membrana basal espessada. O estroma mucinoso o diferencia do TM

O hidroacantoma simplex apresenta diferenciação ductal diferentemente da origem folicular do TM. Não tem membrana basal espessada e nem paliçada periférica. (Alsaad 2007)

1.6.2. Triquilemocarcinoma

O TC deve ser diferenciado de outros tumores cutâneos de células claras (Laochumroonvorapong 2002, Reis 1993, Crowson 2006). O siringoma de células claras e o hidradenoma são proliferações benignas que têm diferenciação para a glândula sudorípara, mas não apresentam o padrão infiltrativo e a atipia citológica característica do TC (Reis 1993).

O hidradenoma maligno de células claras é um carcinoma raro de glândula sudorípara que pode causar metástase, mas se distingue do TC pela ausência de paliçada periférica e pela diferenciação acinar ou ductal, que pode ser demonstrada pelo teste imunohistoquímico com CEA (Reis 1993). O carcinoma sebáceo geralmente surge nas pálpebras, as células finamente vacuolizadas com núcleo indentado e centralizado são características desta neoplasia. Há acentuação do aspecto vacuolado do citoplasma com a imunorreatividade para o EMA (Reis 1993). Células de citoplasma claro, possivelmente representando alterações degenerativas, podem compor os lóbulos epiteliais do CBC e do CEC. Nestes casos a distinção do TC pode ser difícil (Laochumroonvorapong 2002, Reis 1993, Crowson 2006).

Raramente um nevo melanocítico ou um melanoma se constituem predominantemente de células balonizantes. A presença de melanina, ninhos juncionais, agregados alveolares de células tumorais e a imunorreatividade para a proteína S-100 ajudam a distinção do TC (Reis 1993). Mais raramente, metástases cutâneas, como as de carcinoma renal ou lipossarcoma, podem causar dificuldade na diferenciação do TC (Reis 1993).

1.7. Estudos Imunoistoquímicos

1.7.1. Definição

As neoplasias, apesar de se originarem em tecidos normais, muitas vezes perdem sua capacidade de diferenciação celular, tornando impossível ou duvidoso um diagnóstico morfológico baseado nas características da lesão. Daí a necessidade da técnica de imunoistoquímica (IHQ) para auxiliar na elucidação da diferenciação tecidual e, portanto no diagnóstico do tumor. (Melo 1999)

IHQ é o conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos para a detecção de antígenos presentes em células ou tecidos. Para seu reconhecimento, os anticorpos devem estar marcados com algum composto que depois possa ser visualizado seletivamente. (Melo 1999)

A IHQ é atualmente a ferramenta adjunta mais importante na avaliação de tumores devido à sua praticidade e relativo baixo custo. Quanto mais informação se acumula ao longo dos anos, mais padrões típicos de diagnóstico para vários tumores têm surgido. Devido ao padrão complexo de expressão dos vários antígenos, geralmente o uso de painéis de anticorpos é necessário. (Al-Daraji 2009).

No caso dos TAC, principalmente os de origem folicular, vários antígenos podem ser utilizados para a sua correta identificação.

1.7.2. Queratinas

As queratinas (CK) compreendem uma família de filamentos intermediários que formam o citoesqueleto das células epiteliais. Até o momento, já foram identificados cerca de 30 subtipos. A sua expressão varia conforme o estado de diferenciação de cada célula epitelial. (Kanitakis 1999).

Na epiderme interfolicular, a camada suprabasal apresenta CK1 e 10, marcadores de diferenciação terminal (Kurokawa 2003).

No folículo piloso, a CK15 é expressa na bainha externa, assim como na camada basal da epiderme. (Amoh 2010). A CK15 está presente também no *bulge* e é considerada CK de células pluripotentes (Kurokawa 2003). A bainha externa em conexão com o infundíbulo também é positiva para CK16, um marcador de hiperproliferação e de queratinização triquilemal (Kurokawa 2003)⁷.

Um painel de anticorpos anti-queratina possibilita elucidação da origem e diferenciação dos tumores foliculares (Kurokawa 2003).

Quando se compara a expressão de CK no TM com a do TC, a ausência de CK15 e 16 no TC pode estar relacionada à transformação do TM em TC (Kurokawa 2006).

Neste estudo, optamos por realizar as reações para as CK 15 e CK 16 pois a CK marca a bainha externa folicular e a CK16 marca a queratinização triquilemal e a hiperproliferação de células foliculares. Além disso, conforme Kurokawa, 2006, a ausência dessas CK pode estar relacionada à diferenciação de um TM em um TC.

1.7.3. Claudinas

As *tight junctions* (TJ) são estruturas complexas de adesão localizadas na região mais apical da membrana lateral das células epiteliais e endoteliais. Sua função primária é a barreira à difusão de solutos através do meio intercelular e a manutenção da polaridade celular. (Morita 1999, 2003, Yuki 2007, Singh 2010)

As camadas de células positivas para proteínas das TJ no folículo piloso se situam no limite entre o ambiente e o organismo. Portanto, essas moléculas funcionariam como um mecanismo de barreira para as substâncias que entram em contato com a pele. No entanto, o mecanismo exato envolvido na seleção de substâncias ainda é incerto. (Brandner 2003)

A existência e a importância das proteínas que constituem as TJ, que são as claudinas (CL), ocludinas e a ZO-1, só foram demonstradas recentemente. (Brandner 2003) (Singh 2010)

As claudinas compreendem uma família multigênica com aproximadamente 24 membros de aproximadamente 21 a 28 kD. Consistem de quatro domínios transmembrana: duas voltas extracelulares, um domínio amino- carboxi-terminal citoplasmático e uma alça curta citoplasmática. (figura 6) (Furuse 2010, Tebbe 2002, Niessen 2007)

Figura 6. Estrutura química de uma claudina. Figura retirada de Furuse M. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2:a002907.

Os membros da família das claudinas parecem estar expressos de forma anômala quando associados à patogênese de vários cânceres humanos. Acreditava-se que as claudinas diminuiriam durante a tumorigênese em qualquer tecido uma vez que as TJ se perdem na transformação celular. No entanto, observou-se que a expressão de claudinas parece mudar de maneira específica em cada tecido anômalo. (Agarwal 2009)

Por exemplo, as claudinas-3 e 4 estão frequentemente elevadas em vários cânceres inclusive adenocarcinoma ductal pancreático, câncer de próstata, uterino, e ovariano. Por outro lado, os carcinomas hepatocelular e renal expressam níveis reduzidos de claudinas 4 e 5. (Singh 2010, Agarwal 2009)

A CL7 está diminuída em carcinomas invasivos ductais, colorretal, câncer de cabeça e pescoço e câncer de mama metastático. (Agarwal 2009), mas elevada em câncer gástrico. (Hewitt 2006)

A expressão de claudinas-1 e -7 é indetectável em epitélio escamoso cervical normal, mas aumentada em neoplasias cervicais uterinas. (Singh 2010, Agarwal 2009)

A CL11 é a componente principal das TJ que formam a barreira hemato-encefálica e a barreira hemato-testicular, protegendo o encéfalo e testículos do ambiente externo. (Morita 1999) Estudos recentes relatam que a redução da CL11 também resulta em aumento da motilidade e invasão celular no câncer gástrico. (Agarwal 2009)

Também foi demonstrado que a claudina 5 é expressa em altos níveis nas células endoteliais vasculares. (Hewitt 2006)

Como essa mudança na expressão das claudinas contribui para a progressão neoplásica ainda não é claro. Um possível mecanismo é o de que ocorra uma expressão aberrante de certas claudinas nos tecidos afetados que contribui diretamente alterando a estrutura e função da TJ. Além disso, acredita-se que as claudinas possam afetar as vias de sinalização celular, servindo como molécula oncogênica. Portanto, a família das claudinas pode ser um marcador tumoral útil. (Singh 2010)

Para se entender o uso do painel de claudinas nos tumores cutâneos, é preciso, primeiro, entender o seu papel nas células normais da pele. (Tabela 2) Na epiderme humana, várias proteínas de TJ têm sido identificadas. (Proksch 2008, Peltonen 2007, Tebbe 2002) As TJ contendo claudinas estão envolvidas na diferenciação epidérmica (Troy 2007).

Tabela 2. Expressão das claudinas, em pele normal e em neoplasias cutâneas

Marcador	Pele Normal	Neoplasias Cutâneas
CL1	Camada espinhosa, camada basal e bainha externa do folículo piloso.	Expressão aumentada pode ter relação com padrão metastático do melanoma ou tumor pouco diferenciado em CEC oral.
CL3	Células nevocíticas e em queratinócitos de pele normal	Aumentada em CEC oral sugere maior invasão tumoral. Lesões melanocíticas e células do melanoma.
CL4	Camada granulosa e espinhosa da epiderme superior e folículo piloso.	Aumentada em CEC e Bowen indica tumor pouco diferenciado em CEC oral
CL5	Endotélio vascular dérmico. Epiderme interfolicular e anexos cutâneos.	Reduzida ou ausente em CEC da mucosa oral
CL7	Folículos pilosos anágenos	Lesões melanocíticas e células do melanoma. Reduzida em CEC oral. Redução mostrou correlação com invasão vascular e recorrência.
CL11	Folículos pilosos anágenos, células epiteliais da pele normal.	Desconhecido

Dados extraídos de: Brandner 2003; Morita 2003 e 2004; Peltonen 2007; Lourenço 2010b; Troy 2007, Cohn 2005; Brandner 2006, Watson 2007; Soini 2004; Lopardo 2008; Tebbe 2002; Proksch 2008.

No CEC oral, observou-se maior expressão da claudina 3 e menor expressão da claudina 7. (Lourenço 2010b)

Nos melanomas primários, há correlação significativa entre a expressão de claudinas nas células tumorais e a expressura do Breslow/ nível de Clark. Também é significativa a redução na expressão da claudina nos vasos de lesões com Breslow maior. Esses dados sugerem que a perda da CL1 pode ter papel na aquisição do fenótipo metastático do melanoma cutâneo (Cohn 2005).

No melanoma primário de mucosa oral, a diminuição da expressão da CL7 mostra correlação com invasão tumoral vascular. (Lourenço 2010a)

Não encontramos na literatura a descrição do padrão de expressão das claudinas nos tumores anexiais de origem triquilemal, especialmente os triquilemomas e os triquilemocarcinomas.

Portanto, neste estudo avaliaremos a imunomarcagem em TM e TC de um painel de claudinas. As claudinas foram escolhidas baseadas em um estudo anterior realizado em CEC oral e em melanoma oral. (Lourenço 2010 a e b)

1.7.4. CD34

CD34 é uma glicoproteína de 105-120 kDa expressa em células hematopoiéticas progenitoras. Também é encontrada em tecidos não hematopoiéticos. A expressão de CD34 foi descrita em queratinócitos do *bulge* do folículo piloso.

Portanto, o anticorpo monoclonal CD34 pode ser usado para identificar células tumorais derivadas de queratinócitos da bainha externa do folículo piloso ou com diferenciação triquilemal (Haas 2002).

1.7.5. Antígeno p63

Alterações no gene Tp53, localizado no braço curto do cromossomo 17, são as lesões genéticas mais comuns observadas em neoplasias humanas (Fernandez-Figueras 2001). A presença de imunorreatividade ao p53 nas células tumorais pode representar seu comportamento potencialmente agressivo (Fernandez-Figueras 2001).

O gene Tp63, localizado no cromossomo 3q27-29, é um homólogo do gene supressor Tp53 (Takeuchi 2005, regauer 2007). O gene Tp63 é essencial na manutenção de células progenitoras para o desenvolvimento epitelial nos tecidos humanos. Na ausência do p63, o epitélio se mantém uniestratificado. A proteína p63 encontra-se expressa na epiderme e nos apêndices cutâneos normais e desaparece com a diferenciação celular (Takeuchi 2005).

Estudo de Takeuchi et al, 2005, sobre a expressão da proteína p63 em diversos tumores cutâneos revelou que o número de células positivas para o p63 foi maior nos tumores menos diferenciados. Observou-se que, nos tumores de origem folicular, a expressão da p63 foi comparável ao expresso em células normais da matriz do pêlo ou nas células da bainha externa do pêlo. A conclusão é de que a expressão do p63 pode ser um marcador importante de indiferenciação celular (Takeuchi 2005).

1.7.6. Ki67

Em 1983, Gerdes e colaboradores descreveram um anticorpo monoclonal de camundongo dirigido a um antígeno presente em células em proliferação, que foi chamado de Ki67. Após um ano, o mesmo grupo determinou que o antígeno estava presente em todas as células em mitose. Observou-se que esse antígeno está presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, de repouso (Sawaguchi 2004). Portanto, a marcação pelo Ki-67 resulta numa avaliação muito aproximada da fração de crescimento de uma população celular. (Melo 1999)

Entre os marcadores imunológicos de taxa de proliferação celular, o anticorpo monoclonal Ki67 é considerado uma ferramenta confiável na avaliação da taxa de crescimento celular. (Moretti 1990)

A imunorreatividade para o Ki67 auxilia na determinação da taxa de proliferação celular em determinado tecido (Haas 2002). No caso do TC, o seu comportamento biológico com uma evolução raramente letal contrasta com a atipia intensa e a anaplasia bem como com a alta taxa de positividade demonstrada pela imunomarcção pelo Ki67 (Haas 2002).

1.8. Tratamento do TM e TC

No caso do triquilemoma, o tratamento é a excisão cirúrgica, embora seja um tumor benigno. (Cotton 1991)

A excisão cirúrgica completa, mas conservadora também é recomendada para o tratamento do triquilemocarcinoma, evitando a recidiva local ou invasão profunda (Laochumroonvorapong 2002, Billingsley 1997, Song 2000, Allee 2003). Alguns autores têm recomendado o uso da Cirurgia Micrográfica de Mohs para garantir a exérese total (Jo 2005, Garret 2004, Lai 2003).

Estudos recentes têm mostrado eficácia no uso de imiquimod tópico a 5% no tratamento do TC (Jo 2005). Há, entretanto, algumas variantes histológica e biologicamente agressivas (Allee 2003), que demonstram maior risco de invasão e de recorrência (Allee 2003). O principal objetivo no tratamento de tumores de anexo deve ser a excisão completa da lesão com uma margem de segurança de tecido normal. (Cotton 1991).

1.9. Prognóstico

O TM é um tumor anexial benigno. Portanto, a excisão simples é curativa e é o tratamento recomendado. Sua evolução é favorável. (Cotton 1991)

O TC tem uma evolução indolente, relativamente benigna, apesar do seu aspecto citológico maligno e comportamento localmente agressivo (Lai 2003, Ko 1996, Reis 1993, Allee 2003). Pode evoluir com múltiplas recidivas locais, embora as metástases linfonodais sejam raras (Wong 1994) e as metástases à distância inexistentes (Monteagudo 1999). Como não tem um aspecto clínico característico, raramente o diagnóstico de TC é considerado antes do exame anatomopatológico (Reis 1993, Allee 2003).

Os pacientes com TC primário devem ser acompanhados regularmente devido ao risco de recidiva ou de surgimento de nova lesão nos próximos 5 anos após o diagnóstico inicial. (Jin 2005).

Em suma, o TC é um tumor raro, de difícil diagnóstico por não apresentar achados clínicos característicos e que pode ser confundido histologicamente com diversos outros tumores, conforme demonstrado anteriormente.

Tendo em vista seu comportamento potencialmente agressivo, é importante que o diagnóstico seja precoce e preciso, de forma que o tratamento correto seja instituído, evitando recidivas e seqüelas futuras.

Neste contexto, este trabalho se propõe a estudar os dados epidemiológicos, clínicos e imunoistoquímicos do TC e da sua variante benigna, o TM, para tentar estabelecer um padrão que os diferencie e que auxilie no diagnóstico.

2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são:

- a) Analisar comparativamente os dados clínicos e epidemiológicos entre os casos de triquilemoma e de triquilemocarcinoma diagnosticados na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo no período de 1991 a 2006;
- b) Identificar e comparar a expressão de citoqueratinas 15 e 16, claudinas 1,3,4,5,7 e 11, antígeno CD34, do p63 e do índice de proliferação celular pelo Ki67 entre os TM e TC;
- c) Definir um padrão imunofenotípico que auxilie no diagnóstico diferencial do triquilemocarcinoma em relação ao triquilemoma.

3 *Casuística e Métodos*

3.1. Informações gerais

Foi feita revisão de prontuário de todos os casos de TC e TM diagnosticados no período de 1991 e 2009 na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Através da revisão dos prontuários, foram levantados os dados clínicos e epidemiológicos dos doentes. Fez-se a revisão histopatológica de todos os espécimes das lesões dos doentes, assim como a avaliação pelo PAS com e sem diástase.

3.2. Critérios de seleção dos pacientes (inclusão e exclusão)

Os pacientes selecionados para o estudo obedecem aos seguintes critérios:

- a. Ter diagnóstico de triquilemocarcinoma ou de triquilemoma na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP no período de 1991 a 2009.
- b. Diagnóstico histológico confirmado de triquilemoma ou triquilemocarcinoma.
- c. Ter material tecidual em quantidade suficiente para possibilitar a confecção de blocos de matriz tecidual (TMA) para o estudo imunoistoquímico.

3.3. Seqüência do estudo

- a. Aprovação do Estudo pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP.

- b. Levantamento pelo registro hospitalar dos casos de triquilemoma e triquilemocarcinoma no período de 1991 a 2009;
- c. Revisão clínico-epidemiológica através dos dados de prontuário;
- d. Revisão das lâminas em HE e PAS com e sem diastase para confirmação diagnóstica;
- e. Levantamento dos espécimes embebidos em parafina e seleção das áreas para a composição do Tissue MicroArray (TMA);
- f. Montagem do TMA
- g. Corte dos blocos e montagem das lâminas
- h. Realização das técnicas de imunoistoquímica nas lâminas de TMA;
- i. Escaneamento das lâminas pelo sistema ScanScope® da Aperio®;
- j. Leitura das reações nos dois grupos de casos usando o programa ImageScope;
- k. Análise estatística e comparação dos dados obtidos entre os dois grupos: triquilemoma e triquilemocarcinoma.

3.4. Técnica para preparo das lâminas

De cada um dos 15 casos de triquilemocarcinoma e dos 18 casos de triquilemoma foram selecionadas áreas representativas dos aspectos morfológicos das neoplasias para a composição de um TMA. Quando possível pela disponibilidade de material, os casos tiveram mais de 1 área selecionada para melhor caracterização das reações.

O TMA é um método que redistribui numerosos cilindros teciduais de blocos de parafina convencionais (blocos doadores) em um novo bloco (bloco receptor). (Andrade 2007) Deste modo, pequenas amostras representativas de regiões específicas de tecidos de múltiplos pacientes podem ser submetidos a estudos moleculares simultaneamente. (Andrade 2007, Santos 2010) Esta estratégia resulta num significativo corte de custos devido à enorme redução de tempo técnico, assim como da quantidade de reagentes. Permite, ainda, aumentar a consistência de quantificações dos resultados de reações imunoistoquímicas, pois todas as análises passam a ser feitas sob condições idênticas em uma mesma reação.

As áreas seleccionadas foram extraídas do seu bloco com o uso de um extrator de 1mm de diâmetro, dando origem a pequenos cilindros que foram distribuídos no bloco receptor. Neste trabalho, foi feita distribuição dos cilindros em 15 colunas e 5 linhas, de acordo com ordem definida em tabela agrupando os triquilemomas e depois os triquilemocarcinomas. (tabela 3)

Nos últimos 4 casos adquiridos para estudo, sendo 1 triquilemocarcinoma e 4 triquilemomas, os estudos foram feitos em lâminas individualizadas, pois não constituíam grande número para justificar a confecção de TMA.

Cortes histológicos de cinco 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%.

Tabela 3. Distribuição dos casos de triquilemoma e triquilemocarcinoma para a montagem do TMA.

Controle	8	8	6	6	13	13	14	14	2	2	11	4	4	17
12	12	9	9	15	1	1	16	16	1	8	18	10	10	7
5	5	3	3											

Controle	14	14	13	13	7	7	3	3	8	8	5	5	15	15
10	10	12	12	11	1	1	6	6	2	2	4	4	9	9

	Triquilemoma
	Triquilemocarcinoma

A seguir, os cortes histológicos foram desparafinizados em três banhos de xilol à temperatura ambiente durante 20 minutos cada. Posteriormente, foram hidratados em seqüência decrescente de etanol (absoluto, 95% e 70%) e água corrente durante cinco minutos cada.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com seis incubações em água oxigenada 3% por 10 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS) pH 7,4.

3.5. Técnica imunoistoquímica para CK 16 e claudinas:

As lâminas foram submetidas a tratamento para exposição dos sítios antigênicos em calor úmido (panela a vapor) no tampão TRIS/EDTA 10 mM/1 mM pH 9,0, durante 25 minutos após o aquecimento do tampão a 95°C.

As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4.

A seguir, 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 de TMA foram incubadas com os seguintes anticorpos primários:

- a. policlonal anti-claudina 1 (Zymed® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, cód.51-9000) diluído a 1:400;
- b. policlonal anti-claudina 3 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA, cód. RB-9251-PO) diluído a 1:200;
- c. policlonal anti-claudina 4 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA, cód. RB-9266-PO) diluído a 1:200;
- d. policlonal anti-claudina 5 (NeoMarkers, Fremont, CA, USA, cód. RB-9243-PO) diluído a 1:100;
- e. policlonal anti-claudina 7 (Zymed® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, cód.34-9100.) diluído a 1:100;

- f. policlonal anti-claudina 11 (Santa Cruz Biotechnology[®], Inc., Santa Cruz, CA, USA, código sc-25711) diluído a 1:100;
- g. monoclonal (CLONE: LL025) anti-citoqueratina 16 (Novocastra, Newcastle, UK, cód. NCL-CK16) diluído a 1:100 em BSA fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7.4, incubação “over-night” a 4°C.

Depois da incubação *overnight* das lâminas com os respectivos anticorpos, foi feita a lavagem das lâminas por duas vezes em tampão PBS pH 7,4 durante cinco minutos cada. Após isso, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotinilado (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS pH 7,4, por duas vezes, durante cinco minutos cada e incubadas com o complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB+system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, cód. K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C.

As reações foram visualizadas através do cromógeno diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidine, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO/USA, código D5637) 0,03% acrescida de 1,2 ml de água oxigenada 3%.

A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através dos controles positivos que acompanharam as reações. Os controles positivos aos antígenos estudados foram: pele normal para células com expressão de claudinas

1, 3, 4, 5, 7 e 11, e psoríase para citoqueratina 16. Os controles negativos das reações foram obtidos através da omissão do anticorpo primário, que foi substituído por PBS.

As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos, levemente contraincoradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. A seguir foram lavadas 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).

3.6. Técnica imunoistoquímica para CD 34:

Para a reação com o anticorpo CD34, fez-se a exposição antigênica com solução contendo tripsina 0,020% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA, cód. T7409) em PB pH 7,4, durante 20 minutos à temperatura ambiente.

A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada.

Previamente à incubação com o anticorpo primário, 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 o anticorpo primário monoclonal anti-CD34 (Novocastra) diluído a 1:250 em solução de albumina bovina (BSA) fração V (SERVA. 1930) 1% acrescida de azida sódica 0,1% em PBS pH 7,4, “*over-night*” a 4°C.

Após lavagem em PBS pH 7,4 as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG/IgM (mouse/rabbit/goat) biotinilado (LSAB system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C, seguido de lavagem em tampão PBS pH 7,4, por duas vezes durante cinco minutos cada.

Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados com o complexo Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (LSAB system-HRP, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, código K0690) pronto para uso em câmara úmida durante 30 minutos a 37°C, seguido de lavagem em tampão PBS pH 7,4, por duas vezes durante cinco minutos cada.

A seguir, 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%. A intensidade da cor foi controlada ao microscópio óptico através do controle positivo que acompanhou a reação (Fragmento de pele normal).

Os cortes histológicos, após os procedimentos de revelação das reações foram lavados em água corrente por cinco minutos, contracorados com Hematoxilina de Harris por 28 segundos, lavados em água corrente, desidratados em etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi feita com resina Permunt (FISHER Scientific, Fair Lawn, NJ/USA, cód. SP15-100).

3.7. Técnica imunoistoquímica para p63 e Ki67:

Foi feita a recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (Merck, E.U.A.) em panela a vapor. Após a fervura da água, foi colocado o recipiente com as lâminas banhada em solução de recuperação, por 40 minutos. Após resfriamento por 20 minutos à temperatura ambiente, procedeu-se a lavagens em água corrente e água destilada.

Fez-se a seguir o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H_2O_2) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada e depois lavagens em água corrente e água destilada.

Depois foi feita lavagem com PBS 10 mM pH 7,4 por 5 minutos e o bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed) por 10 minutos a 37° C. A seguir fez-se a incubação com os anticorpos primários:

- a. p63 – clone 4B1E12 – Invitrogen, título 1:800
- b. Ki 67 – clone MIB1 – DAKO cód. M7240-1, título 1:200

Os anticorpos específicos foram diluídos em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA, E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN_3 (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS. O material foi mantido em câmara úmida: 30 min. a 37° C e, em seguida, 18 horas (*over night*) a 4° C.

Depois foram feitas lavagens em PBS pH 7,4, com três trocas de 5 minutos cada seguidas de incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37° C. Fez-se nova lavagem com PBS pH 7,4 (3 trocas de 3 a 5 minutos cada).

Na seqüência, fez-se a incubação com NovoLink (Polimer) do mesmo kit por 30 minutos a 37 °C e a revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C e lavagens em água corrente e água destilada.

A contra-coloração foi com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.

Procedeu-se à desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em xilol e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imunoistoquímica compreendem, um controle sabidamente positivo para o anticorpo em estudo (amostra de pele normal para o p63 e de amígdala normal para o Ki67). O controle negativo da reação foi obtido pela eliminação do anticorpo primário que era substituído por PBS nos procedimentos técnicos.

3.8. Escaneamento e Leitura das Lâminas:

Após realizadas as reações, as lâminas foram encaminhadas para o Laboratório Diagnóstika onde foram escaneadas e digitalizadas através do sistema ScanScope® da Aperio® (Figura 7).

Figura 7. Imagem de lâmina do TMA com reação imunoistoquímica para o antígeno CK16 escaneada pelo sistema ScanScope da Aperio e visualizado pelo programa ImageScope.

O programa ImageScope[®] da mesma empresa, fornecido gratuitamente no site www.aperio.com, permite a análise das lâminas com definição perfeita, permitindo facilidade na ampliação das imagens e comparação de setores da mesma lâmina (Figura 8). Além disso, torna-se possível o compartilhamento de informações à distância e a análise em qualquer local que disponha de computador, sem a necessidade de um laboratório com microscópio.

A leitura foi feita por dois pesquisadores distintos para maior precisão. Cada fragmento foi analisado quanto à positividade, negatividade ou ausência de representação. Foi considerado sem representação o fragmento que não tivesse tecido tumoral representado na amostra ou que tivesse tumor em parcela menor

que $\frac{1}{4}$ da amostra. Além disso, cada fragmento positivo foi analisado quanto à reatividade em todo o tumor ou em apenas parte dele.

Figura 8. A. Amostra de triquilemoma visualizada pelo programa ImageScope® com aumento original de 5x. B. Mesma amostra de triquilemoma visualizada em parte pelo programa ImageScope® com aumento original de 20x. Técnica de imunohistoquímica com o anticorpo claudina 3 do paciente 16.

3.9. Análise Estatística:

Toda a análise estatística foi feita com o auxílio da estatística Rossana Mendoza López do departamento de Tisiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP.

A avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foi feita através do cálculo da média e desvio-padrão e da mediana considerando os valores das medidas como *scores*, e foram apresentadas as frequências e porcentagens para as variáveis categóricas. Para avaliação da significância

estatística, usou-se o teste T de Student para as variáveis idade, tempo de evolução e tempo de seguimento. Para as demais variáveis, utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson.

Já a análise dos achados de imunoistoquímica foram avaliados de 2 formas. Primeiro foi testada associação entre os pacientes com triquilemoma e triquilemocarcinoma e as variáveis medidas segundo cada pesquisadora utilizando-se o teste de associação qui-quadrado de Pearson. Utilizou-se o teste T de Student para comparação das médias de valores do Ki67 em cada grupo de resultados segundo pesquisadora.

Segundo, para avaliar se houve diferença estatística entre as leituras das duas pesquisadoras, utilizou-se um teste de igualdade de *scores*. Utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon e foi analisado de forma separada para cada diagnóstico.

4 Resultados

4.1. Triquilemoma

No período de 1991 a 2009, foram diagnosticados 34 casos de triquilemoma (TM) na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Destes 34 casos, doze foram excluídos do estudo, sendo 9 por falta de material para a realização dos estudos imunoistoquímicos e 3 por inconsistência diagnóstica, constatada durante a revisão das lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (HE). Destes casos, os diagnósticos foram os de hidradenoma poróide, carcinoma espinocelular e o outro inconclusivo.

Portanto, foram válidos para estudo 22 casos de triquilemoma.

4.1.1. Dados epidemiológicos

Todos os dados epidemiológicos dos casos de TM são apresentados na tabela 4.

Dos 22 casos válidos, 15 são homens e 7 mulheres. A idade média foi de 49,71 anos, com desvio-padrão de 20,62. Um dos casos não apresentava registro de idade. A pele branca foi a mais freqüente, sendo descrita em 16 casos, cor parda em 2 casos e 4 casos sem determinação de cor da pele em registros hospitalares.

Havia relato de exposição solar crônica em prontuários de 12 pacientes, 2 negavam exposição e nos demais não constava relato. Ao exame clínico, foram

constatadas evidências de dano actínico em 11 pacientes, variando desde queratose actínicas, CBC, CEC e até melanoma maligno em 1 caso.

Diversas comorbidades foram encontradas em 16 dos 22 pacientes. As enfermidades mais freqüentes foram Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) em 7 e Diabetes Mellitus (DM) em 5 casos. Três dos casos não apresentavam descrição de qualquer doença associada.

Há um caso de transplante renal em uso de imunossupressão, dois casos de xeroderma pigmentoso (XP), um caso de retrovirose (SIDA), e um paciente com câncer de esôfago metastático.

Tabela 4. Tabela com os dados epidemiológicos dos casos de triquilemoma.

	Idade	Sexo	Cor	Comorbidade	Sol	Tumores cutaneos
1	37	M	?	HIV	?	-
2	21	M	B	XP	+	QA, CEC, angiossarcoma
3	76	M	B	HAS	+	CBC
4	76	M	B	HPB	+	CBCs
5	17	M	?	-	-	-
6	?	F	?	HAS, DLP, DPOC	+	CBCs
7	73	F	B	HAS, demência	+	—
8	68	M	B	HAS	?	-
9	19	M	?	-	-	-
10	47	F	B	Nódulo de mama D	?	-
11	52	M	B	-	+	CBCs
12	62	F	B	CA mama e reto, neo esofago metastático	+	CBC
13	39	M	B	Tx renal, TB pulmão, DM	+	CBC, CEC, QA, MM
14	62	M	P	Hérnia umbilical	?	-
15	77	M	B	HAS,DM	?	-
16	53	M	B	Tabagista	+	QA
17	16	F	P	XP, DM 1, RDNPM	+	CBC, CEC
18	64	M	B	AVC, DM, HAS, Hipotireoidismo	+	CBC, QAS
19	56	F	B	?	?	?
20	26	M	B	vítiligo, cutis vertice girata	?	?
21	44	F	B	Sínd Cowden/ HAS/ ca mama	?	?
22	59	M	B	DM	+	CBC/CEC

?: não disponível; M= masculino; F= feminino; B= branco; P= pardo; XP: xeroderma pigmentoso; HAS: hipertensão arterial; DLP: dislipidemia; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; CA: carcinoma; Tx: transplante; DM: diabetes melitus; AVC: acidente vascular cerebral; + presente; - ausente; QA: queratose actínica; CBC: carcinoma basocelular; CEC: carcinoma espinocelular

4.1.2. Dados clínicos

A lesão apresentava aspecto variado, sendo a maioria (19/22) descrita como pápula que pode ser queratósica, eritematosa, perlácea ou filiforme. Outras descrições foram de nódulo cor da pele e placa vegetante. (Figura 9)

Figura 9. Triquilemoma identificado sobre nevo sebáceo congênito (paciente número 10).

O local mais acometido pelo TM (figura 10) foi a cabeça com 20 dos casos, sendo 4 em couro cabeludo e os demais 16 em face. Houve apenas 2 casos descritos em membro inferior. Nenhum caso ocorreu em tronco.

Figura 10. Desenho esquemático mostrando a distribuição dos casos de TM.

O tempo de evolução da lesão até o diagnóstico só estava disponível nos registros hospitalares de 8 dos 22 pacientes e variou de 4 meses a 19 anos.

Os tratamentos instituídos foram de dois tipos: eletrocoagulação (ECG) acompanhada de curetagem (CTG) e/ou retirada por shaving (SVG) em 14 casos e excisão em fuso nos 8 casos restantes. Dos tratados com excisão cirúrgica simples, apenas 1 registrava a margem de segurança utilizada: 3mm. Nos demais não havia anotação em prontuário.

O seguimento dos pacientes foi registrado em apenas 9 dos casos. Esse seguimento ambulatorial variou de 1 a 5 anos, com média de 32,67 meses ou 2,72 anos. Não foram registrados sinais de recidiva. (Tabela 5)

Tabela 5. Tabela com os dados clínicos das lesões de triquilemoma.

	Lesão	Local	Tempo	Tto	Seguimento
1	Pápula queratósica	Temporal E	4 meses	Ctg+ecg	NC
2	Pápula queratósica infiltrada	Perna E	?	Fuso + margem 3mm	SSR 3 anos
3	Pápula eritematoso	Infralabial E	5 anos	Svg+ctg+ecg	4,5 anos SSR
4	Pápula queratósica	Pálpebra superior E	1 ano	Fuso	
5	Pápula filiforme	Asa nasal D	10 anos	Svg+ecg	NC
6	Pápula eritematosa, erodida	Mento	?	Fuso	2 anos SSR
7	Nódulo 0,8cm	Pré-auricular E	?	Fuso	NC
8	Pápula cor da pele pedunculada, filiforme	Fossa nasal D	6 meses	Svg+ecg	NC
9	Placa verrucosa bem delimitada	Parieto-occipital E	19 anos	Fuso	NC
10	Placa eritêmato- acastanhada, vegetante	Frontal D	?	Fuso	NC
11	Pápula lisa purpúrica	Narina D	?	Svg+ecg	NC
12	Pápula eritêmato- infiltrada	Columela nasal	?	Svg+ctg+ecg	NC
13	Pápula queratósica	Couro cabeludo	?	Fuso	5 anos SSR
14	Pápula queratósica cor da pele	Supralabial E	?	Svg+ctg+ecg	
15	Pápula perlácea	Infralabial D	?	Svg+ctg+ecg	1ano SSR
16	Pápula perlácea 0,3cm	Infralabial E	?	Svg+ctg+ecg	
17	Pápula hiperocrômica	Canto olho E	?	Svg+ctg+ecg	1ano SSR
18	Pápula eritemato- queratósica	supralabial D	?	Svg+ecg	5 anos SSR
19	pápula perlácea	Couro cabeludo	9 meses	fuso	NC
20	pápula queratósica	Pré-tibial E	?	SVG+ECG	1a8m
21	Pápula queratósica	Face (Asanasal E e olho D)	?	SVG+ECG	NC
22	pápula queratósica	Lábio inferior E	4 meses	Ctg+ecg	1a4m

? dado não disponível; SVG= shaving; CTG= curetagem; ECG= eletrocoagulação

4.1.3. Dados histológicos

Para se fazer a avaliação histológica, utilizou-se um protocolo de análise das lâminas de acordo com as características propostas para o diagnóstico de TM (Weedon 2010). Analisou-se a presença de arquitetura lobular, de células claras, de diferenciação escamosa, de microcistos, de paliçada periférica colunar, de membrana basal hialinizada, de corno cutâneo, a qualidade do estroma e a resposta à coloração com o PAS e após o tratamento com diastase.

Todos os 22 casos válidos de TM apresentavam neoplasia constituída de células claras (figura 11 e 12), e em 21 deles havia presente a arquitetura lobular característica. Em apenas um deles não foi possível constatar tal arquitetura lobular.

Figura 11. Dados histológicos de triquilemoma (paciente 2) mostrando ao aumento de 40x a neoplasia constituída de arquitetura lobular (A) e maior detalhamento das células claras (B). Coloração por hematoxilina e eosina com aumentos originais de 40x e 100x respectivamente.

Figura 12. Aspectos histopatológicos de triquilemoma (paciente 16), destacando a arquitetura lobular (A) e a membrana basal proeminente (B). Coloração pela hematoxilina e eosina, aumentos originais de 40x (A) e 200x (B).

A paliçada periférica estava presente em todos os espécimes avaliados (figura 13). O estroma era predominantemente fibroso, sendo desmoplásico nos casos 7, 16 e 18 (figura 14).

Figura 13. Dados histológicos de triquilemoma (paciente 16) demonstrando a paliçada periférica evidente (seta) no caso 16. Coloração pela hematoxilina e eosina, aumento original de 100x.

Figura 14. Dados histológicos de triquilemoma (paciente 16) evidenciando o estroma de aspecto fibroso (A) e o aspecto desmoplásico B. Coloração por hematoxilina e eosina, aumentos originais de 100x e 200x respectivamente.

A diferenciação escamosa não estava presente em 4 amostras (casos 5, 9, 14 e 15). Os microcistos foram encontrados apenas em 4 casos (casos 5,6,8 e 10). O corno cutâneo foi identificado apenas nos casos 5 e 17.

Todos os casos apresentavam leitura positiva com a coloração com o PAS com sensibilidade das células tumorais à diástase (figura 15).

Figura 15. Aspectos histológicos de triquilemoma (paciente 16), evidenciando a coloração pelo PAS (A) e a sensibilidade ao tratamento com diástase (B). Aumentos originais de 200x.

Nestes 22 casos, os achados histológicos descritos acima, avaliados em conjunto, permitiram a confirmação do diagnóstico de TM e a inclusão neste estudo.

4.1.4. Dados Imunoistoquímicos

A leitura das reações imunoistoquímicas foi feita por 2 pesquisadores. Os resultados das leituras de cada um são apresentados nas tabelas 6 e 7.

A coluna F significa FINAL, e indica se a leitura era positiva ou negativa. Nessa coluna, os resultados são apresentados como 0= negativo; 1= positivo. A coluna EXT, significa extensão e indica se a reação era detectada em toda a amostra ou apenas parcialmente. Nessa coluna, os resultados são apresentados como: 0= negativo, 1= positivo parcial e 2= positivo total. Essa separação foi feita para facilitar a análise estatística.

Os casos que tinham mais de uma amostra foram representados com um único resultado. Considerava-se o mais significativo. Por exemplo, se uma amostra era positiva e outra negativa, considerava-se o resultado como positivo para o caso.

No item de resultados comparativos, serão apresentadas as análises comparativas das leituras dos dois pesquisadores e entre os dois tipos de tumor.

Tabela 6. Leitura das reações de IHQ dos casos de TM conforme o pesquisador 1.

	CK15 f	CK15 ext	CK1 6F	CK16 ext	CL1 F	CL1 ext	CL3 F	CL3 ext	CL 4F	CL4 ext	CL5 F	CL5 ext	CL 7F	CL7 ext	CL1 1F	CL11 ext	CD3 4F	CD34 ext	p63 F	P63 ext
1	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2
2	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
3	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2
4	0	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	SR	SR	0	0	1	1
5	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2
6	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	SR	SR	0	0	1	1	0	0	SR	SR
7	0	0	1	1	SR	SR	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
8	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
9	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
10	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
11	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
12	0	0	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2
13	0	0	1	1	SR	SR	SR	SR	1	1	1	1	SR	SR	SR	SR	0	0	SR	SR
14	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	0	0	1	2
15	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
16	0	0	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
17	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	0	0	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR
18	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2
19	0	0	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	2
20	0	0	1	2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
21	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0	1	2
22			1	2	1	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2

Na coluna F, 0= negativo; 1= positivo. Na coluna EXT, 0= negativo; 1= positivo parcial; 2= positivo total. SR= sem representação.

Tabela 7. Leitura das reações de IHQ dos casos de TM conforme o pesquisador 2.

	CK15 f	CK15 ext	CK16 F	CK16 ext	CL1 F	CL1 ext	CL3 F	CL3 ext	CL4 F	CL4 ext	CL5 F	CL5 ext	CL7 F	CL7 ext	CL11 F	CL11 ext	CD34 F	CD34 ext	p63 F	p63 ext
1	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
2	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	1
3	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2
4	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	SR	SR	0	0	1	1
5	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
6	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	1
7	0	0	1	2	0	0	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1
8	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2
9	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	1
10	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SR	SR	SR	SR
12	0	0	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2
13	0	0	1	2	SR	SR	SR	SR	1	2	1	1	0	0	1	2	0	0	1	1
14	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	1
15	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	0	0	0	0	0	0	SR	SR	SR	SR
16	0	0	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
17	0	0	1	2	1	2	1	2	SR	SR	SR	SR	0	0	0	0	SR	SR	SR	SR
18	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
19	0	0	1	1	1	2	0	0	1	2	1	1	0	0	1	1	1	1	1	2
20	0	0	1	2	1	1	0	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2
21	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	0	0	1	2	0	0	1	2
22	0	0	1	2	1	2	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2

F= resultado final; ext= extensão da imunomarcção

Na coluna F, 0= negativo; 1= positivo. Na coluna EXT, 0= negativo; 1= positivo parcial; 2= positivo total. SR= sem representação.

4.2. Triquilemocarcinoma

Foram diagnosticados 26 casos de TC na Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo no período de 1991 a 2009.

Destes, 10 casos foram excluídos, sendo 5 por material insuficiente para a realização dos estudos imunoistoquímicos e os outros 5 por inconsistência diagnóstica constatada durante a revisão das lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (HE). Destes casos, os diagnósticos foram os de: carcinoma basocelular em dois casos, carcinoma espinocelular em outros dois e queratose seborréica em mais um. Portanto, foram válidos para estudo 16 casos de triquilemocarcinoma.

4.2.1. Dados epidemiológicos

Todos os dados epidemiológicos dos casos de TC estão detalhados na tabela 8.

Dos 16 casos válidos de triquilemocarcinoma, 5 são homens e 11 mulheres. A idade média de 71,81 anos, com desvio-padrão de 10,11. A pele de cor branca foi a predominante, sendo detectada em 13 dos 16 casos. Nos 3 casos restantes, não constava cor de pele no relato do prontuário.

Exceto por 4 casos, todos os demais tinham história de exposição solar crônica registrada em prontuário. Oito dos 16 casos apresentavam evidência de lesão actínica atual ou prévia, como queratoses actínicas, carcinomas basocelulares e carcinomas espinocelulares.

Apenas dois dos casos apresentavam imunossupressão. Um dos casos estava em uso de medicação oral para controle de rejeição por transplante renal. O segundo caso tinha histórico de leucemia, mas já em remissão.

Outras comorbidades foram encontradas em 8 dos 16 pacientes. As enfermidades mais freqüentes foram HAS 6/16, DM 2/16, DPOC 1/16. Seis dos casos não apresentavam relato de qualquer doença associada.

Tabela 8. Dados epidemiológicos dos casos de triquilemocarcinoma.

N.	Idade	Sexo	Cor	Comorbidades	Sol	Tumores cutâneos
1	65	M	B	HAS	+	CBC
2	84	F	B	HAS	+	—
3	82	F	B	?	+	CBC/QA
4	70	F	?	-	+	CBCs
5	65	M	B	HAS/DM	+	?
6	84	F	B	HAS/IAM	+	?
7	48	F	B	HAS	?	?
8	68	M	B	HAS/DM	+	CBC/CEC
9	68	M	B	DPOC/ tabagista	+	CBC
10	67	M	?	?	?	?
11	63	F	B	Tx renal	?	?
12	68	F	B	?	+	QAs
13	86	F	B	?	?	?
14	76	F	B	?	+	?
15	82	F	?	leucemia linfocitária	+	CBC
16	73	F	B	HAS/ talassemia	+	CEC/CBC/QA

?: não disponível em prontuário; M: masculino; F: feminino; HAS: hipertensão arterial; AVC: acidente vascular cerebral; DM: diabetes; IAM: infarto do miocárdio; DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica; TX: transplante; =: presente; - ausente; CBC: carcinoma basocelular; CEC: carcinoma espinocelular; QA: queratose actínica.

4.2.2. Dados clínicos

A descrição clínica da lesão tumoral variou consideravelmente, desde pápula perlácea, lesão queratósica, placa infiltrada com ulceração até nódulo verrucoso ou vegetante. (Figuras 16 e 17)

Figura 16. Triquilemocarcinoma sob corno cutâneo (paciente 7).

Figura 17. Triquilemocarcinoma retroauricular (paciente 12).

O local mais comumente afetado foi a cabeça (figura 18), em 9 dos casos, sendo 6 em face, 2 nas orelhas e 1 em couro cabeludo. O tronco foi acometido em 4 casos, a região cervical em 1 caso e 2 casos em membros.

Figura 18. Desenho esquemático mostrando a distribuição dos casos de TC.

O tempo de evolução da lesão até o diagnóstico só estava disponível nos registros de 7 dos 16 casos. Nestes, variou de 3 meses a 7 anos.

Quanto ao tratamento, dez dos casos foram tratados com excisão cirúrgica simples em fuso. Destes 10, dois foram removidos com margem de segurança de 0,5cm, um com margem de 1cm de diâmetro e os sete sem registro de margem. Os demais casos foram tratados das seguintes formas: três com cirurgia micrográfica de Mohs e três com eletrocoagulação associada a *shaving* ou curetagem.

Dez pacientes tiveram seguimento clínico registrado em prontuário, com tempo de acompanhamento variando de 1 mês a 8 anos, média de 24,57 meses, sem sinais de recidiva ou metástases. (Tabela 9)

Tabela 9. Dados clínicos dos casos de triquilemocarcinoma.

Casos	Lesão	Local	Tempo	Tratamento	Seguimento
1	Pápula	tronco	?	fuso	1mês
2	Pápula	tronco	5 anos	fuso	7anos
3	Pápula	cabeça	8 meses	Mohs	8 anos
4	?	cabeça	?	ECG	NC
5	Nódulo	tronco	?	Fuso	NC
6	Pápula	cabeça	2 meses	Fuso	NC
7	?	cabeça	?	Fuso	2ano
8	?	cabeça	?	Mohs	3 anos
9	Placa	pescoço	?	Fuso	NC
10	?	membro	?	Fuso	NC
11	Pápula	cabeça	07 anos	Mohs	3 anos
12	Placa	cabeça	9 meses	Fuso	1ano
13	Nódulo	cabeça	3 meses	Fuso	11meses
14	pápula	tronco	6 meses	ECG	NC
15	Pápula	cabeça	?	Fuso	6 meses
16	Placa	membro	?	ECG	4meses

? dado não disponível; SSR sem sinais de recidiva; SVG= shaving; CTG= curetagem; ECG= eletrocoagulação

4.2.3. Dados histológicos

Para se fazer a avaliação histológica, utilizou-se um protocolo de análise das lâminas de acordo com as características propostas para o diagnóstico de TC. (Weedon 2010). Analisou-se a presença de multilobulação, de conexão com a epiderme (Figura 19), de conexão com o complexo pilossebáceo, de crescimento infiltrativo (Figuras 20A e 21), de queratinização triquilemal, de paliçada periférica, de membrana basal hialinizada, e a reação à coloração com o PAS e a reação após o tratamento com diastase.

A multilobulação e a conexão com a epiderme foram encontradas em todos os casos.

Figura 19. A. Aspectos histológicos de triquilemocarcinoma (paciente 2) evidenciando as células claras que formam blocos com conexão epidérmica (A e B) e Coloração pela hematoxilina e eosina com aumentos originais de 40x e 100x respectivamente.

A conexão com o complexo pilossebáceo (figura 20B) não foi observada nos casos 4,5,6 e 9. A queratinização triquilemal estava presente em 8 casos.

Figura 20.A. Acentuada atipia celular em triquilemocarcinoma (paciente 8). Coloração pela hematoxilina e eosina, aumento original 200x. B. Aspectos histológicos de triquilemocarcinoma (paciente 8) mostrando conexão do tumor com o folículo pilossebáceo. Coloração pela hematoxilina e eosina, com aumento original de 100x.

Todos os casos apresentavam paliçada periférica evidente. O crescimento infiltrativo foi observado nos casos 4, 13, 14 e 16 (figura 21). Crescimento expansivo foi observado no caso 10.

Figura 21. Triquilemocarcinoma (paciente 14) demonstrando o crescimento infiltrativo. Coloração por hematoxilina e eosina com aumento original de 100x.

A membrana basal estava hialinizada apenas nos casos 10, 12, 14 e 16. A coloração pelo PAS foi positiva em todos os casos bem como a sensibilidade à diástase (figura 22).

Figura 22. A. Triquilemocarcinoma (paciente 2) evidenciando coloração pelo PAS (A) e sensibilidade a diástase (B). Triquilemocarcinoma (paciente 14) evidenciando coloração com PAS (C) e a sensibilidade ao tratamento com diástase (D).

Nestes 16 casos, os achados histológicos descritos acima, avaliados em conjunto, permitiram a confirmação do diagnóstico de TC e a inclusão neste estudo.

4.2.4. Dados Imunoistoquímicos

A leitura das reações IHQ para os casos de TC foi feita por 2 pesquisadores. Os resultados das leituras de cada pesquisador seguem nas tabelas 10 e 11.

A coluna F, significa FINAL, e indica se a leitura era positiva ou negativa. A coluna EXT, significa extensão e indica se a reação era detectada em toda a amostra ou apenas parcialmente.

Os casos que tinham mais de uma amostra foram representados com um único resultado. Considerava-se o mais significativo. Por exemplo, se uma amostra era positiva e outra negativa, considerava-se o resultado como positivo para o caso.

No item 6.3.3 e 6.3.4 sobre resultados comparativos, serão apresentadas as análises comparativas das leituras dos dois pesquisadores e entre os dois tipos de tumor.

Tabela 10. Leitura das reações de IHQ dos casos de TC conforme o pesquisador 1.

	CK15f	CK15 ext	CK16 f	CK16 ext	CL1 f	CL1 ext	CL3 f	CL3 ext	CL4 f	CL4 ext	CL5 f	CL5 ext	CL7 f	CL7 ext	CL11 f	CL11 ext	CD34 f	CD34 ext	p63 f	p63 ext
1	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	2
2	0	0	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	0	0	0	1	2
3	0	0	1	1	1	2	1	2	1	1	SR	SR	1	1	1	2	0	0	1	2
4	0	0	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	0	0	0	0	1	1
5	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	2	0	0	0	1	2
6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	SR	SR	SR	SR	0	0	0	0	SR	SR
7	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
8	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	2
9	0	0	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	0	0	1	1
10	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	2
11	0	0	1	1	1	2	1	2	0	0	1	1	1	1	2	0	0	0	1	1
12	0	0	SR	SR	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
13	0	0	1	1	1	2	1	2	0	0	0	0	1	1	1	2	0	0	1	1
14	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	0	0	1	2
15	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR
16	0	0	1	2	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2

F= resultado final; ext= extensão da imunomarcção

Na coluna F, 0= negativo; 1= positivo. Na coluna EXT, 0= negativo; 1= positivo parcial; 2= positivo total. SR= sem representação.

Tabela 11. Leitura das reações de IHQ dos casos de TC conforme o pesquisador 2.

	CK15 f	CK15 ext	CK16 F	CK16 ext	CL1 F	CL1 ext	CL3 F	CL3 ext	CL4 F	CL4 ext	CL5 F	CL5 ext	CL7 F	CL7 ext	CL11 F	CL11 ext	CD34 F	CD34 ext	p63 F	p63 ext
1	0	0	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	0	0	1	2
2	0	0	1	2	1	1	1	2	1	1	0	0	1	2	1	2	0	0	1	2
3	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	0	0	1	2
4	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	SR	SR	1	1
5	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	2	1	2	SR	SR	1	2
6	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0
7	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	2	1	2	0	0	1	2
8	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	2
9	0	0	1	1	1	2	1	2	1	1	0	0	1	2	1	2	0	0	1	1
10	0	0	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	0	0	1	2
11	0	0	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	2	0	0	1	2
12	0	0	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	SR	0	0	1	2
13	0	0	1	1	1	2	1	2	0	0	1	2	1	2	1	2	SR	SR	1	1
14	0	0	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0	0	1	2
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	SR	SR	SR	SR
16	0	0	1	2	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2

F= resultado final; ext= extensão da imunomarcção

Na coluna F, 0= negativo; 1= positivo. Na coluna EXT, 0= negativo; 1= positivo parcial; 2= positivo total. SR= sem representação.

4.3. Dados comparativos

Serão agora apresentados os resultados por categoria comparando os grupos triquilemoma e triquilemocarcinoma. Seguem as tabelas com dados comparativos associados aos resultados estatísticos relacionados em cada categoria.

4.3.1. Dados Epidemiológicos

A tabela 12 apresenta os dados do levantamento epidemiológico dos casos de TM e de TC deste trabalho.

Constam desta tabela os dados de idade em anos, sexo, cor, comorbidades associadas, existência ou não de evidências de dano solar além da presença e tipo de tumores cutâneos associados.

Os resultados são apresentados na forma de média mais desvio-padrão em uma linha e a mediana com variações máxima e mínima na linha seguinte para os valores de idade. Para os demais itens, foram apresentados resultados na forma de média mais desvio-padrão. Na última coluna, está listado o p da comparação de cada variável.

Tabela 12. Distribuição dos pacientes com diagnóstico de triquilemoma e triquilemocarcinoma segundo idade, sexo, cor e comorbidades.

	Triquilemoma N=22	Triquilemocarcinoma N=16	Total N=38	Valor de p
<i>Idade (em anos)¹</i>				
Média (DP) ²	49,71 (20,62)	71,81 (10,11)	59,27 (20,05)	<0,001 ³
Mediana (mínimo-máximo)	53 (16-77)	69 (48-86)	65 (16-86)	
<i>Sexo</i>				
Feminino, n (%)	7 (31,8)	11 (68,8)	18 (47,4)	0,024 ⁴
Masculino, n (%)	15 (68,2)	5 (31,3)	20 (52,6)	
<i>Cor</i>				
Branco, n (%)	16 (72,7)	13 (81,3)	29 (76,3)	0,214 ⁴
Pardo, n (%)	2 (9,1)	0	2 (5,3)	
S/I, n (%) ⁵	4 (18,2)	3 (18,8)	7 (18,4)	
<i>Comorbidades</i> n (%)				
DM	1 (4,5)	0	1 (2,6)	0,544 ⁴
DPOC, tabagista	0	1 (6,3)	1 (2,6)	
HAS	5 (22,7)	4 (25,0)	9 (23,7)	
HAS+DM	2 (9,1)	2 (12,5)	4 (10,5)	
HIV	1 (4,5)	0	1 (2,6)	
Leucemia linfocitária	0	1 (6,3)	1 (2,6)	
Neo. Esôfago	1 (4,5)	0	1 (2,6)	
Nódulo mama	1 (4,5)	0	1 (2,6)	
Tabagista	1 (4,5)	0	1 (2,6)	
Tx cardíaco	0	1 (6,3)	1 (2,6)	
Tx renal	1 (4,5)	1 (6,3)	2 (5,3)	
Vitiligo, cútis vértice girata	1 (4,5)	0	1 (2,6)	
XP, DM1, RDNPM	2 (9,1)	0	2 (5,3)	
Nenhuma	5 (22,7)	1 (6,3)	6 (15,8)	
S/I ⁵	1 (4,5)	5 (31,3)	6 (15,8)	

¹ Um caso sem informação. ² DP=Desvio padrão. ³ Teste t de Student. ⁴ Teste qui-quadrado de Pearson. ⁵ S/I=Sem informação.

Observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes com triquilemoma e triquilemocarcinoma ($p < 0,001$). A idade média dos pacientes com triquilemocarcinoma foi de 71,81 anos e a idade média dos pacientes com diagnóstico de triquilemoma foi de 49,71 anos. Também foi possível observar uma associação entre sexo e o diagnóstico, pacientes do sexo masculino foram mais freqüentes para o diagnóstico de triquilemoma, por outro lado pacientes do sexo

feminino foram mais freqüentes para o diagnóstico de triquilemocarcinoma ($p=0,024$).

Em relação à cor, a maioria dos pacientes foi da raça branca (76,3%), não se observou associação entre raça e diagnóstico. A comorbidade mais comum presente entre os indivíduos participantes do estudo foi hipertensão arterial (HAS), em ambos os grupos de comparação.

4.3.2. Dados Clínicos dos Tumores

A tabela 13 apresenta os dados clínicos relacionados aos tumores nas duas versões benigna e maligna.

Os tumores de cada tipo foram avaliados quanto à descrição morfológica da lesão, o local acometido, o tempo de evolução relatado pelo paciente em meses, o tipo de tratamento instituído e o tempo de seguimento.

Os tumores foram agrupados conforme a caracterização morfológica em nódulo, pápula ou placa. Os resultados foram apresentados na forma de média e desvio-padrão do número de casos com cada forma de apresentação.

O local afetado está descrito em maiores detalhes nas tabelas 5 e 9, mas para facilitar a análise estatística, os locais foram agrupados em cabeça, pescoço, tronco e membros. Os resultados são apresentados na forma de média e DP

O tempo de evolução da doença, dado em meses, foi fornecido pelo paciente na consulta médica e registrado em prontuário. Vários casos não possuíam esse registro. Foi calculada a média dos valores disponíveis.

O tratamento oferecido variou desde curetagem e eletrocoagulação em dois ciclos, shaving e eletrocoagulação, retirada por fuso ou cirurgia micrográfica de Mohs. Para análise, as opções terapêuticas foram reunidas nas seguintes categorias: eletrocoagulação, fuso ou cirurgia micrográfica de Mohs.

Por fim, o seguimento clínico dado ao paciente após o procedimento cirúrgico terapêutico foi registrado em meses. Nem todos os casos possuíam seguimento. Os resultados nesta tabela apresentam as médias dos valores disponíveis.

Tabela 13. Características clínicas dos pacientes com diagnóstico de triquilemoma e triquilemocarcinoma.

	Triquilemoma N=22	Triquilemocarcinoma N=16	Total N=38	Valor de p
<i>Exposição ao sol</i>				0,173 ³
Negativo, n (%)	2 (9,1)	0	2 (5,3)	
Positivo, n(%)	12 (54,5)	12 (75,0)	24 (63,2)	
S/I, n (%) ¹	8 (36,4)	4 (25,0)	12 (31,6)	
<i>Tumores cutâneos</i>				0,586 ³
CBC, n (%)	6 (27,3)	4 (25,0)	10 (26,3)	
CBC, CEC, n (%)	2 (9,1)	2 (12,5)	4 (10,5)	
Múltiplos, n (%)	1 (4,5)	1 (6,3)	2 (5,3)	
QA, n (%)	1 (4,5)	1 (6,3)	2 (5,3)	
QA, CEC, angiossarcoma	1 (4,5)	0	1 (2,6)	
Nenhum, n (%)	8 (36,4)	1 (6,3)	9 (23,7)	
S/I, n (%) ¹	3 (13,6)	7 (43,8)	10 (26,3)	
<i>Lesão</i>				0,180 ³
Nódulo, n (%)	1 (4,5)	2 (12,5)	3 (7,9)	
Pápula, n (%)	19 (86,4)	7 (43,8)	26 (68,4)	
Placa, n (%)	2 (9,1)	3 (18,8)	5 (13,2)	
S/I, n (%) ¹	0	4 (25,0)	4 (10,5)	
<i>Local</i>				0,038 ³
Cabeça, n (%)	20 (90,9)	9 (56,3)	29 (76,3)	
Membro, n (%)	2 (9,1)	2 (12,5)	4 (10,5)	
Pescoço, n (%)	0	1 (6,3)	1 (2,6)	
Tronco, n (%)	0	4 (25,0)	4 (10,5)	
<i>Tempo (meses)</i>				0,365 ⁴
Média (DP)	55,38 (80,84)	24,57 (33,23)	41,00 (63,20)	
Mediana (mínimo-máximo)	10,50 (4-228)	8,00 (2-84)	9,00 (2-228)	
<i>Tratamento</i>				0,008 ³
ECG, n (%)	14 (63,6)	3 (18,8)	17 (44,7)	
Fuso, n (%)	8 (36,4)	10 (62,5)	18 (47,4)	
Mohs, n (%)	0	3 (18,8)	3 (7,9)	
<i>Seguimento (meses)</i>				0,935 ⁴
Média (DP) ²	32,67 (20,40)	33,78 (34,38)	33,22 (27,43)	
Mediana (mínimo-máximo)	24,00 (12-60)	24,00 (1-96)	24,00 (1-96)	

¹ S/I=Sem informação. ² DP=Desvio padrão; ³ Teste qui-quadrado de Pearson. ⁴ Teste t de Student.

Não foi observada associação entre a exposição ao sol e o diagnóstico, embora exposição ao sol fosse observada em ambos os grupos. O grupo de pacientes com triquilemocarcinoma foi o que apresentou uma maior exposição ao sol.

Do total de pacientes, 26,3% apresentaram carcinoma basocelulares, o grupo dos triquilemomas apresentou 6 casos e o grupo de triquilemocarcinomas 4 casos. Não houve associação estatisticamente significativa entre os tumores cutâneos e o diagnóstico ($p=0,586$).

Lesões do tipo pápula foram comuns em ambos os grupos estudados, sendo dos pacientes com triquilemomas, 86,4% apresentaram lesões tipo pápula, e 43,8% dos pacientes com triquilemocarcinoma apresentaram esse tipo de lesão. Lesões tipo placa foram mais freqüentes entre pacientes com triquilemocarcinoma (18,8%) comparado com os pacientes com triquilemoma (9,1%).

Houve associação estatisticamente significativa entre o local da lesão e o diagnóstico ($p=0,038$). Pacientes com triquilemoma apresentaram mais lesões na cabeça (90,9%) comparada com os pacientes com triquilemocarcinoma (56,3%).

O tempo de seguimento foi maior nos pacientes com triquilemoma (55,38 meses) em relação aos pacientes com triquilemocarcinoma (24,57 meses).

Observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos realizados ($p=0,008$). A maioria dos pacientes com triquilemoma recebem ECG (63,6%), seguido do Fuso (36,4%). Para os pacientes com triquilemocarcinoma o tratamento mais comum é Fuso (62,5%), seguido de ECG (18,8%).

Não foi possível observar diferenças significativas entre os tempos de seguimentos para todos os participantes da pesquisa. Em média o tempo de seguimento foi de 33,22 meses.

4.3.3. Dados Imunoistoquímicos por pesquisador

Os resultados das reações IHQ foram comparadas entre os dois grupos de tumor conforme a leitura de cada pesquisador.

Foi feita análise não-paramétrica por pesquisador, considerando-se os valores como *scores* e utilizou-se o teste de Mann-Whitney para testar a hipótese de que havia diferença entre as medianas dos dois grupos. Tabelas 14 e 15

Tabela 14. IHQ segundo diagnóstico, pesquisador 1, análise não-paramétrica.

		Triquilemoma	Triquilemocarcinoma	Total	Valor p ²
Ck16 final	Média (DP) ¹	1,14 (0,35)	1,13 (0,34)	1,13 (0,34)	0,965
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Ck16 extensão	Média (DP) ¹	1,91 (0,61)	1,75 (0,68)	1,84 (0,64)	0,492
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cl1 final	Média (DP) ¹	1,23 (0,43)	1,00 (0,37)	1,13 (0,41)	0,271
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl1 extensão	Média (DP) ¹	2,14 (0,56)	1,56 (0,73)	1,89 (0,69)	0,026
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cl3 final	Média (DP) ¹	1,05 (0,58)	1,00 (0,37)	1,03 (0,49)	0,827
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl3 extensão	Média (DP) ¹	1,77 (0,92)	1,88 (0,62)	1,82 (0,80)	0,872
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cl4 final	Média (DP) ¹	1,14 (0,35)	0,88 (0,50)	1,03 (0,43)	0,223
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl4 extensão	Média (DP) ¹	1,65 (0,73)	1,19 (0,83)	1,45 (0,80)	0,129
	Mediana	1,50	1,00	1,00	
Cl5 final	Média (DP) ¹	1,05 (0,58)	0,81 (0,75)	0,95 (0,66)	0,326
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl5 extensão	Média (DP) ¹	1,41 (0,96)	1,19 (1,17)	1,32 (1,04)	0,473
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl7 final	Média (DP) ¹	0,86 (0,71)	1,00 (0,52)	0,92 (0,63)	0,549
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl7 extensão	Média (DP) ¹	1,14 (1,08)	1,25 (0,86)	1,18 (0,98)	0,569
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl11 final	Média (DP) ¹	1,14 (0,64)	0,81 (0,54)	1,00 (0,62)	0,171
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl11 extensão	Média (DP) ¹	1,82 (1,01)	1,38 (0,96)	1,63 (1,00)	0,201
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cd34 final	Média (DP) ¹	0,86 (0,71)	0,13 (0,50)	0,55 (0,72)	0,002
	Mediana	1,00	0	0	
Cd34 extensão	Média (DP) ¹	1,27 (1,12)	0,19 (0,75)	0,82 (1,11)	0,002
	Mediana	1,00	0	0	
P63 final	Média (DP) ¹	1,27 (0,46)	1,13 (0,34)	1,21 (0,41)	0,455
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
P63 extensão	Média (DP) ¹	2,05 (0,72)	1,75 (0,68)	1,92 (0,71)	0,258
	Mediana	2,00	2,00	2,00	

¹ DP: Desvio padrão. ² Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Houve diferenças estatísticas entre as medianas dos grupos diagnósticos para a variável Cl1 extensão. Também houve diferenças significativas entre as medianas das variáveis Cd34 final e Cd34 extensão. Para outras variáveis não houve diferenças significativas.

Tabela 15. Resultado de IHQ segundo diagnóstico, pesquisador 2, análise não-paramétrica.

		Triquilemoma	Triquilemocarcinoma	Total	Valor p ²
Ck16 final	Média (DP) ¹	1,05 (0,38)	1,00 (0,37)	1,03 (0,37)	0,827
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Ck16 extensão	Média (DP) ¹	1,86 (0,64)	1,69(0,70)	1,79 (0,66)	0,473
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cl1 final	Média (DP) ¹	1,05 (0,49)	0,94 (0,44)	1,00 (0,47)	0,630
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl1 extensão	Média (DP) ¹	1,91 (0,75)	1,56 (0,81)	1,76 (0,79)	0,191
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cl3 final	Média (DP) ¹	0,91 (0,61)	0,94 (0,44)	0,92 (0,54)	0,872
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl3 extensão	Média (DP) ¹	1,68 (1,00)	1,69 (0,79)	1,68 (0,90)	0,804
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cl4 final	Média (DP) ¹	1,09 (0,43)	0,88 (0,50)	1,00 (0,47)	0,326
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl4 extensão	Média (DP) ¹	1,91 (0,68)	1,25 (0,86)	1,63 (0,82)	0,019
	Mediana	2,00	1,00	2,00	
Cl5 final	Média (DP) ¹	0,95 (0,49)	0,63 (0,62)	0,82 (0,56)	0,122
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl5 extensão	Média (DP) ¹	1,55 (0,86)	0,94 (1,00)	1,29 (0,96)	0,064
	Mediana	2,00	1,00	1,00	
Cl7 final	Média (DP) ¹	0,68 (0,57)	0,88 (0,50)	0,76 (0,54)	0,356
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl7 extensão	Média (DP) ¹	1,32 (1,04)	1,63 (0,89)	1,45 (0,98)	0,473
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cl11 final	Média (DP) ¹	0,86 (0,56)	0,94 (0,44)	0,89 (0,51)	0,715
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
Cl11 extensão	Média (DP) ¹	1,59 (0,96)	1,81 (0,75)	1,68 (0,87)	0,589
	Mediana	2,00	2,00	2,00	
Cd34 final	Média (DP) ¹	0,82 (0,73)	0,50 (0,89)	0,68 (0,81)	0,162
	Mediana	1,00	0	0	
Cd34 extensão	Média (DP) ¹	1,18 (1,14)	0,75 (1,34)	1,00 (1,23)	0,162
	Mediana	1,00	0	0	
P63 final	Média (DP) ¹	1,18 (0,40)	1,00 (0,37)	1,11 (0,39)	0,388
	Mediana	1,00	1,00	1,00	
P63 extensão	Média (DP) ¹	1,86(0,71)	1,75 (0,68)	1,82 (0,69)	0,827
	Mediana	2,00	2,00	2,00	

¹ DP: Desvio padrão. ² Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

É possível observar que houve diferenças significativas entre as medianas da variável Cl4 extensão (p=0,019). Para outras variáveis não houve diferenças estatisticamente significativas.

Quanto ao índice de proliferação mitótica calculado pelo ki67, a comparação dos seus resultados entre os grupos de doenças foi feito pelo teste T de Student. (tabela16)

Tabela 16. Comparação do Ki 67 entre os pacientes com triquilemoma e triquilemocarcinoma.

	Triquilemoma N=22	Triquilemocarcinoma N=16	Total N=38	Valor de p
<i>Ki67</i> ¹				
Média (DP) ²	26,13 (14,31)	30,83 (19,00)	28,24 (16,44)	0,454 ³
Mediana (mínimo-máximo)	21,07 (5,5-53,0)	29,08 (0-63,3)	24,83 (0-63,3)	

¹ Seis casos sem informação para Triquilemoma e três casos sem informação para Triquilemocarcinoma. ² DP=Desvio padrão. ³ Teste t de Student.

Não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre as médias do Ki67 para os diagnósticos de triquilemoma e triquilemocarcinoma (p=0,454).

4.3.4. Concordância entre as leituras dos dois pesquisadores:

Com o objetivo de observar a concordância entre as pesquisadoras utilizou-se a estatística de Kappa. (tabela 17)

Tabela 17. Concordância entre observadoras para os pacientes com diagnóstico de Triquilemoma (medidas finais).

Observadora 1 ¹	N (%) ³	Observadora 2 ²		
		Negativo	Positivo	SR
Ck16 final	Negativo	0	0	0
	Positivo	0	19 (86,4)	0
	SR ⁴	1 (4,5)	0	2 (9,1)
Cl1 final	Negativo	0	0	0
	Positivo	1	17 (77,3)	0
	SR ⁴	2 (9,1)	0	3 (13,6)
Cl3 final K=0,822 p<0,001	Negativo	3 (13,6)	0	0
	Positivo	1 (4,5)	14 (63,6)	0
	SR ⁴	1 (4,5)	0	3 (13,6)
Cl4 final	Negativo	0	0	0
	Positivo	0	18 (81,8)	1 (4,5)
	SR ⁴	1 (4,5)	0	2 (9,1)
Cl5 final K=0,481 p=0,002	Negativo	1 (4,5)	1 (4,5)	1 (4,5)
	Positivo	0	15 (68,2)	0
	SR ⁴	2 (9,1)	1 (4,5)	1 (4,5)
Cl7 final K=0,609 p<0,001	Negativo	5 (22,7)	2 (9,1)	0
	Positivo	0	11 (50,0)	0
	SR ⁴	3 (13,6)	0	1 (4,5)
Cl11 final K=0,580 p<0,001	Negativo	2 (9,1)	1 (4,5)	0
	Positivo	0	13 (59,1)	0
	SR ⁴	3 (13,6)	1 (4,5)	2 (9,1)
Cd34 final K=0,927 p<0,001	Negativo	7 (31,8)	0	0
	Positivo	1 (4,5)	10 (45,5)	0
	SR ⁴	0	0	4 (18,2)
P63 final K=0,744 p<0,001	Negativo	0	0	0
	Positivo	0	16 (72,7)	4 (18,2)
	SR ⁴	0	2 (9,1)	4 (18,2)

¹ Observadora 1: Dra. Miriam. ² Observadora 2: Dra. Nadia. ³ Porcentagem do total. ⁴ SR: Sem representação.

Observou-se concordância estatisticamente significativa para as medidas de Cl3, Cl5, Cl7, Cl11, Cd34 e P63 final entre as duas pesquisadoras.

Tabela 18. Concordância entre observadoras para os pacientes com diagnóstico de Triquilemocarcinoma (medidas finais).

Observadora 1 ¹	N (%) ³	Observadora 2 ²		
		Negativo	Positivo	SR
Ck16 final	Negativo	0	0	0
	Positivo	0	14 (87,4)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	1 (6,3)
Cl1 final K=0,549 p=0,003	Negativo	1 (6,3)	0	0
	Positivo	0	13 (81,3)	1 (6,3)
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0
Cl3 final K=0,549 p=0,003	Negativo	1 (6,3)	0	0
	Positivo	0	13 (81,3)	1 (6,3)
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0
Cl4 final K=0,529 p=0,010	Negativo	2 (12,5)	1 (6,3)	0
	Positivo	0	11 (68,8)	1 (6,3)
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0
Cl5 final K=-0,032 p=0,864	Negativo	2 (12,5)	3 (18,8)	1 (6,3)
	Positivo	3 (18,8)	4 (25,0)	0
	SR ⁴	2 (12,5)	1 (6,3)	0
Cl7 final K=0,538 p=0,004	Negativo	1 (6,3)	0	1 (6,3)
	Positivo	0	12 (75,0)	0
	SR ⁴	2 (12,5)	0	0
Cl11 final K=0,385 p=0,044	Negativo	0	2 (12,5)	1 (6,3)
	Positivo	0	11 (68,8)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0
Cd34 final K=0,333 p=0,074	Negativo	12 (75,0)	0	3 (18,8)
	Positivo	0	0	0
	SR ⁴	0	0	1 (6,3)
P63 final	Negativo	0	0	0
	Positivo	0	14 (87,5)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	1 (6,3)

¹ Observadora 1: Dra. Miriam. ² Observadora 2: Dra. Nadia. ³ Porcentagem do total. ⁴ SR: Sem representação.

Foi observada concordância entre as observadoras para as medidas de Cl1, Cl3, Cl4, Cl7, Cl11 e Cd34 final nos pacientes com triquilemocarcinoma (Tabela 18).

Tabela 19. Concordância entre observadoras para os pacientes com diagnóstico de Triquilemoma (variáveis de extensão).

Observadora 1 ¹	N (%) ³	Observadora 2 ²			
		Negativo	Parcial	Total	SR
Ck16 extensão	Negativo	0	0	0	0
	Parcial	0	3 (13,6)	2 (9,1)	0
	Total	0	0	14 (63,6)	0
	SR ⁴	1 (4,5)	0	0	2 (9,1)
Cll extensão	Negativo	0	0	0	0
	Parcial	0	0	1 (4,5)	0
	Total	0	0	15 (68,2)	0
	SR ⁴	2 (9,1)	0	0	3 (13,6)
Cl3 extensão	Negativo	3 (13,6)	0	0	0
	Parcial	1 (4,5)	0	2 (9,1)	0
	Total	0	0	12 (54,5)	0
	SR ⁴	1 (4,5)	0	0	3 (13,6)
Cl4 extensão	Negativo	0	0	0	0
	Parcial	0	2 (9,1)	8 (36,4)	1 (4,5)
	Total	0	1 (4,5)	7 (31,8)	0
	SR ⁴	1 (4,5)	0	0	2 (9,1)
Cl5 extensão K=0,261 p=0,022	Negativo	1 (4,5)	0	1 (4,5)	1 (4,5)
	Parcial	0	5 (22,7)	6 (27,3)	0
	Total	0	1 (4,5)	3 (13,6)	0
	SR ⁴	2 (9,1)	0	1 (4,5)	1 (4,5)
Cl7 extensão	Negativo	5 (22,7)	0	2 (2,1)	0
	Parcial	0	0	9 (40,9)	0
	Total	0	0	2 (9,1)	0
	SR ⁴	3 (13,6)	0	0	1 (4,5)
Cl11 extensão K=0,462 p<0,001	Negativo	2 (9,1)	0	1 (4,5)	0
	Parcial	0	1 (4,5)	3 (13,6)	0
	Total	0	0	9 (40,9)	0
	SR ⁴	3 (13,6)	0	1 (4,5)	2 (9,1)
Cd34 extensão K=0,876 p<0,001	Negativo	7 (31,8)	0	0	0
	Parcial	1 (4,5)	5 (22,7)	0	0
	Total	0	1 (4,5)	4 (18,2)	0
	SR ⁴	0	0	0	4 (18,2)
P63 extensão K=0,711 p<0,001	Negativo	0	0	0	0
	Parcial	0	4 (18,2)	1 (4,5)	0
	Total	0	1 (4,5)	10 (45,5)	0
	SR ⁴	0	2 (9,1)	0	4 (18,2)

¹ Observadora 1: Dra. Miriam. ² Observadora 2: Dra. Nadia. ³ Porcentagem do total. ⁴ SR: Sem representação.

Concordância significativa foi observada entre as duas pesquisadoras para as medidas de Cl5, Cl11, Cd34 e p63 extensão para os pacientes com diagnóstico de triquilemoma.

Tabela 20. Concordância entre observadoras para os pacientes com diagnóstico de Triquilemocarcinoma (variáveis de extensão).

Observadora 1 ¹	N (%) ³	Observadora 2 ²			
		Negativo	Parcial	Total	SR
Ck16 extensão	Negativo	0	0	0	0
	Parcial	0	4 (25,0)	2 (12,5)	0
	Total	0	0	8 (50,0)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0	1 (6,3)
Cl1 extensão K=0,490 p=0,004	Negativo	1 (6,3)	0	0	0
	Parcial	0	3 (18,8)	2 (12,5)	1 (6,3)
	Total	0	1 (6,3)	7 (43,8)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0	0
Cl3 extensão K=0,556 p<0,001	Negativo	1 (6,3)	0	0	0
	Parcial	0	1 (6,3)	0	0
	Total	0	1 (6,3)	11 (68,8)	1 (6,3)
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0	0
Cl4 extensão K=0,624 p<0,001	Negativo	2 (12,5)	1 (6,3)	0	0
	Parcial	0	5 (37,5)	1 (6,3)	1 (6,3)
	Total	0	0	4 (25,0)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0	0
Cl5 extensão K=-0,049 p=0,739	Negativo	2 (12,5)	2 (12,5)	1 (6,3)	1 (6,3)
	Parcial	3 (18,8)	0	1 (6,3)	0
	Total	0	1 (6,3)	2 (12,5)	0
	SR ⁴	2 (12,5)	1 (6,3)	0	0
Cl7 extensão K=-0,037 p=0,649	Negativo	1 (6,3)	0	0	1 (6,3)
	Parcial	0	0	10 (62,5)	0
	Total	0	1 (6,3)	1 (6,3)	0
	SR ⁴	2 (12,5)	0	0	0
Cl11 extensão	Negativo	1 (6,3)	0	2 (12,5)	1 (6,3)
	Parcial	0	0	3 (18,8)	0
	Total	0	0	8 (50,0)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0	0
Cd34 extensão K=0,333 p=0,074	Negativo	11 (75,0)	0	0	3 (18,8)
	Parcial	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0
	SR ⁴	0	0	0	1 (6,3)
P63 extensão	Negativo	0	0	0	0
	Parcial	0	3 (18,8)	3 (18,8)	0
	Total	0	0	8 (50,0)	0
	SR ⁴	1 (6,3)	0	0	1 (6,3)

¹ Observadora 1: Dra. Miriam. ² Observadora 2: Dra. Nadia. ³ Porcentagem do total. ⁴ SR: Sem representação.

Houve concordância significativa entre as pesquisadoras para as medidas de CI1, CI3 e CI4 extensão nos pacientes com diagnóstico de triquilemocarcinoma. Não houve uma concordância significativa entre as medidas de CI5, CI7 e Cd34 extensão nesse mesmo grupo de pacientes.

No entanto, a avaliação por kappa tem limitação devido ao fato de terem sido utilizados escores para a leitura dos marcadores.

Portanto, a forma encontrada para confirmar as diferenças entre as diferentes leituras foi utilizar um teste de igualdade de scores. Usamos o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Os testes foram realizados de forma separada para cada diagnóstico. (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21. Comparação entre observadoras para o diagnóstico de Triquilemoma.

		Triquilemoma		Valor p ²
		Dra. Miriam	Dra. Nádia	
Ck16 final	Média (DP) ¹	1,14 (0,35)	1,05(0,38)	0,317
	Mediana	1,00	1,00	
Ck16 extensão	Média (DP) ¹	1,941 (0,64)	1,86 (0,64)	1,000
	Mediana	2,00	2,00	
Cl1 final	Média (DP) ¹	1,23 (0,43)	1,05 (0,49)	0,157
	Mediana	1,00	1,00	
Cl1 extensão	Média (DP) ¹	2,14 (0,56)	1,91(0,75)	0,276
	Mediana	2,00	2,00	
Cl3 final	Média (DP) ¹	1,05 (0,58)	0,91 (0,61)	0,180
	Mediana	1,00	1,00	
Cl3 extensão	Média (DP) ¹	1,77 (0,92)	1,68 (1,00)	0,705
	Mediana	2,00	2,00	
Cl4 final	Média (DP) ¹	1,14 (0,35)	1,09 (0,43)	0,655
	Mediana	1,00	1,00	
Cl4 extensão	Média (DP) ¹	1,64 (0,73)	1,91 (0,68)	0,107
	Mediana	1,50	2,00	
Cl5 final	Média (DP) ¹	1,05 (0,58)	0,95 (0,49)	0,581
	Mediana	1,00	1,00	
Cl5 extensão	Média (DP) ¹	1,41 (0,96)	1,55 (0,86)	0,516
	Mediana	1,00	2,00	
Cl7 final	Média (DP) ¹	0,86 (0,71)	0,68 (0,57)	0,214
	Mediana	1,00	1,00	
Cl7 extensão	Média (DP) ¹	1,14 (1,08)	1,32 (1,04)	0,382
	Mediana	1,00	2,00	
Cl11 final	Média (DP) ¹	1,14 (0,64)	0,86 (0,56)	0,098
	Mediana	1,00	1,00	
Cl11 extensão	Média (DP) ¹	1,82 (1,01)	1,59 (0,96)	0,433
	Mediana	2,00	2,00	
Cd34 final	Média (DP) ¹	0,86 (0,71)	0,82 (0,73)	0,317
	Mediana	1,00	1,00	
Cd34 extensão	Média (DP) ¹	1,27 (1,12)	1,18 (1,14)	0,157
	Mediana	1,00	1,00	
P63 final	Média (DP) ¹	1,27 (0,46)	1,18 (0,40)	0,157
	Mediana	1,00	1,00	
P63 extensão	Média (DP) ¹	2,05 (0,72)	1,86 (0,71)	0,194
	Mediana	2,00	2,00	

¹ DP: Desvio padrão. ² Teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Não houve diferenças estatisticamente significativas para as medidas avaliadas pelas duas pesquisadoras.

Tabela 22. Comparação entre observadoras para o diagnóstico de Triquilemocarcinoma.

		Triquilemocarcinoma		Valor p ²
		Dra. Miriam	Dra. Nádia	
Ck16 final	Média (DP) ¹	1,13 (0,34)	1,00 (0,37)	0,317
	Mediana	1,00	1,00	
Ck16 extensão	Média (DP) ¹	1,75 (0,68)	1,69 (0,70)	1,000
	Mediana	2,00	2,00	
Cl1 final	Média (DP) ¹	1,00 (0,37)	0,94 (0,44)	0,655
	Mediana	1,00	1,00	
Cl1 extensão	Média (DP) ¹	1,56 (0,73)	1,56 (0,81)	0,891
	Mediana	2,00	2,00	
Cl3 final	Média (DP) ¹	1,00 (0,37)	0,94 (0,44)	0,655
	Mediana	1,00	1,00	
Cl3 extensão	Média (DP) ¹	1,88 (0,62)	1,69 (0,79)	0,414
	Mediana	2,00	2,00	
Cl4 final	Média (DP) ¹	0,88 (0,50)	0,88 (0,50)	1,000
	Mediana	1,00	1,00	
Cl4 extensão	Média (DP) ¹	1,19 (0,83)	1,25 (0,86)	0,713
	Mediana	1,00	1,00	
Cl5 final	Média (DP) ¹	0,81 (0,75)	0,63 (0,62)	0,490
	Mediana	1,00	1,00	
Cl5 extensão	Média (DP) ¹	1,19 (1,17)	0,94 (1,00)	0,547
	Mediana	1,00	1,00	
Cl7 final	Média (DP) ¹	1,00 (0,52)	0,88 (0,50)	0,564
	Mediana	1,00	1,00	
Cl7 extensão	Média (DP) ¹	1,25 (0,86)	1,63 (0,89)	0,172
	Mediana	1,00	1,00	
Cl11 final	Média (DP) ¹	0,81 (0,54)	0,94 (0,44)	0,577
	Mediana	1,00	1,00	
Cl11 extensão	Média (DP) ¹	1,38 (0,96)	1,81 (0,75)	0,200
	Mediana	2,00	2,00	
Cd34 final	Média (DP) ¹	0,13 (0,50)	0,50 (0,89)	0,083
	Mediana	0	0	
Cd34 extensão	Média (DP) ¹	0,19 (0,75)	0,75 (1,34)	0,083
	Mediana	0	0	
P63 final	Média (DP) ¹	1,13 (0,34)	1,00 (0,37)	0,317
	Mediana	1,00	1,00	
P63 extensão	Média (DP) ¹	1,75 (0,68)	1,75 (0,68)	0,705
	Mediana	2,00	2,00	

¹ DP: Desvio padrão. ² Teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Não houve diferenças entre os escores das duas pesquisadoras para as medidas realizadas nos pacientes.

5 Discussão

Esse trabalho detectou, num período de 18 anos, 22 casos de triquilemoma e 16 casos de triquilemocarcinoma válidos para estudo mais detalhado.

Tanto para a versão benigna quanto para a maligna houve grande dificuldade técnica para a aquisição de dados com base nos registros de prontuário. Muitas fichas dermatológicas com informações incompletas e fichas cirúrgicas inadequadamente preenchidas foram encontradas. Como pôde ser observado nas tabelas de dados clínicos, vários dados importantes como cor, história de exposição solar, antecedentes pessoais, seguimento clínico, tempo de evolução da doença, etc não constavam em vários casos, limitando as análises.

A educação de profissionais e estudantes para a realização de estudos a partir de dados de prontuário é imprescindível. O médico deve ter a consciência da importância do preenchimento correto e completo dos dados de prontuário, não só para facilitar o atendimento futuro do paciente por outros profissionais, mas também para melhorar a qualidade dos estudos realizados a partir desta base de dados.

Quando se fez a comparação estatística entre os dados clínicos e epidemiológicos dos dois grupos de tumores, observou-se uma diferença significativa entre a idade dos grupos, o gênero, o local da lesão e o tipo de tratamento instituído. Conforme estabelecido em literatura, o grupo do TC predomina em pacientes mais velhos (Jo 2005, Laochumroonvorapong 2002, Garret 2004, Billingsley 1997, Song 2000, Reis 1993, Garret 2003, Chan 1999, Nakatani 1998, Crowson 2006, Oyama 2008), enquanto que nos TM afeta adultos (Ghazarian, 2007 e Cotton 1991). Quanto ao gênero, há uma discordância: aqui predomina o sexo feminino entre os

TC e o sexo masculino entre os TM, enquanto que nos demais trabalhos há equivalência entre os gêneros. Quanto ao local da lesão, a literatura cita predomínio de acometimento de cabeça e pescoço para os dois tipos de tumor, sem a diferença apresentada aqui. E no quesito tratamento, entre os TM a opção predominante foi de eletrocoagulação e entre os TC foi a excisão cirúrgica. Esse resultado era mesmo esperado, em função do diferente comportamento biológico dos dois tipos de tumor.

Para os demais dados avaliados, não houve diferença estatística entre os dois grupos. No entanto, há alguns dados importantes a serem ressaltados:

Apenas um dos pacientes de TM tinha diagnóstico de síndrome de Cowden. Conforme os relatos de outros trabalhos, todos os nossos casos apresentavam lesão única. Os casos de síndrome de Cowden habitualmente apresentam múltiplos TM.

Os dois casos de xeroderma pigmentoso e os dois dos casos de imunossupressão entre os TM ocorreram em pacientes adultos mais jovens, o que provavelmente favoreceu o surgimento das lesões, embora benignas, nestes casos.

Quanto à descrição morfológica da lesão, em acordo com a literatura, não foi detectado um aspecto característico que definisse o diagnóstico nos dois tipos de tumor. Todos os nossos casos foram diagnosticados por exame anatomopatológico.

O local mais acometido pelo TM foi a cabeça (90,9%), conforme descrito em literatura (Ghazarian 2007). São áreas de exposição solar e mais ricas em folículos pilosos, o que provavelmente contribui para a maior incidência. Já entre

os TC, 56,3% dos casos afetaram cabeça e 1 caso afetou pescoço. Houve também 4 casos em tronco (25%). Destes últimos, todos eram em mulheres e acometiam a porção superior do tórax anterior. Isso pode ser devido ao fato de as mulheres usarem roupas que expõem o colo mais comumente do que os homens, tornando essa região uma área fotoexposta.

Quanto ao tempo de evolução das neoplasias, a aquisição desse dado foi prejudicada pela limitação de dados em prontuário. O tempo de evolução da lesão até o diagnóstico só estava disponível nos registros hospitalares de 36,4% dos pacientes de TM. Em média o tempo de evolução até o diagnóstico foi de 55,38 meses. Entre os casos de TC, houve registro de tempo em 43,75% dos casos. A análise dos resultados desses casos demonstrou média de 24,57 meses. Portanto, entre os casos malignos, o tempo entre o surgimento da lesão e o diagnóstico foi mais curto, o que poderia sugerir um crescimento mais intenso ou mais rápido que gerou a demanda por atendimento médico num menor intervalo de tempo.

A literatura também descreve um tempo de evolução de menos de 1 ano, com uma fase de crescimento rápido (Billingsley 1997). Entre os nossos casos, não havia descrição de fase de crescimento rápido, mas os dados eram escassos.

O seguimento dos pacientes após o tratamento teve a mesma limitação dos registros em prontuário que o tempo de evolução. Entre os nove casos de TM seguidos, o tempo médio de seguimento foi de 32,67 meses ou 2,72 anos. Mas por se tratar de lesão benigna, nenhum acompanhamento é necessário. Entre os TC, não houve seguimento clínico em 7 casos (43,75%). Em se tratando de uma população idosa, é fácil supor que pode ter havido limitações por agravamento do

estado de saúde ou mesmo óbito. Não foi registrado nenhum caso de recidiva, diferente do relatado em outros trabalhos que citam um tumor altamente agressivo e recidivante. Também não foi observado nenhum caso de metástase à distância nem de comprometimento nodal, o que é compatível com os dados de literatura (Monteagudo 1999).

A escolha do uso do TMA para a realização das imunomarcações foi feito pela praticidade e otimização dos recursos. Os benefícios da patologia digital são a automação, padronização e análises mais complexas das imagens. Além disso, permite o compartilhamento e a análise à distância dos dados.

Quando se fez a análise estatística não-paramétrica dos resultados das leituras de IHQ de cada um dos dois pesquisadores, os resultados variaram entre os pesquisadores. Para o pesquisador 1, houve diferença estatística entre as medianas dos dois grupos de tumores para as reações com CL1 extensão e CD34. Tanto a claudina-1 quanto o CD34 apresentavam resultados com medianas mais altas nos casos de TM que nos de TC.

Para a análise não-paramétrica do pesquisador 2, as medidas de CL4 extensão apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes. Houve aumento significativo entre os casos do grupo do TM em relação ao grupo TC.

A claudina 1 encontra-se presente na pele normal e pode ser útil como marcador da bainha externa de folículos pilosos (Tebbe 2002, Brandner 2003). A Claudina-4 é encontrada da epiderme superior normal (Brandner 2003). Os achados provavelmente se devem a uma perda de diferenciação tecidual no sentido em que a lesão benigna (TM) passa a ser maligna (TC). Embora sejam de

mesma origem, as células perdem marcadores de diferenciação tecidual. Esses achados, portanto, são compatíveis com o esperado para essa neoplasia.

Em relação ao CD34, a sua menor expressão entre os TC sugere também uma perda de diferenciação em relação à sua versão benigna.

Quanto à análise da porcentagem de expressão do Ki67, não houve diferença significativa entre os grupos, diferente do que seria esperado em função do comportamento mais agressivo do TC.

Para os demais reagentes não houve diferença estatística entre os grupos. A CL3 encontra-se expressa em queratinócitos da pele normal (Watson 2007) e demonstrou ter expressão aumentada em casos de CEC oral (Lourenço 2010b). No entanto, neste trabalho, não se observou qualquer alteração entre as versões benigna e maligna.

Da mesma forma, a CL7 é expressa em folículos pilosos na pele normal (Soini 2004), portanto se manteve inalterada nos dois tumores de mesma origem. A sua alteração em casos de CEC oral (Lourenço 2010 b) não foi demonstrada neste estudo.

A CK16 indica hiperproliferação e queratinização triquilemal (Kurokawa 2003). Considerando-se duas neoplasias de origem folicular, o esperado seria encontrar a sua expressão mantida nos dois tumores. Conforme esperado, não houve diferença significativa.

O P63 se expressa mais intensamente em células tumorais pouco diferenciadas (Takeuchi 2005). Neste estudo, os dois grupos expressaram igualmente a proteína.

Quando se avaliou a concordância entre as leituras dos dois pesquisadores, não se observou diferença estatisticamente significativa.

Ou seja, houve concordância entre as leituras dos dois pesquisadores. Essa convergência de resultados garante a maior precisão e confiabilidade das leituras utilizadas neste trabalho.

O índice Ki67 deveria ser mais acentuado nas células tumorais malignas em função do seu comportamento biológico mais agressivo.

Conforme os resultados obtidos aqui, pode-se estabelecer que os TM acometem pacientes adultos do sexo masculino enquanto os TC acometem idosos do sexo feminino.

As claudinas 3 e 7 se expressaram tanto em TM quanto TC sem distinção. O mesmo ocorreu com a CK 16 e o p63.

A diferenciação pode ser feita através da imunomarcacão para o CD 34 que é menor ou ausente no TC e pelas claudinas 1 e 4, que perdem a sua expressão nos casos malignos.

6 Conclusão

- a) Os dados epidemiológicos e clínicos dos dois grupos de tumores se distinguem em relação à idade, gênero, local de acometimento e tipo de tratamento. Observou-se uma maior incidência de TM entre adultos masculinos enquanto que os TC predominaram entre os idosos femininos. Os tratamentos utilizados diferem conforme esperado para neoplasias de diferentes comportamentos.
- b) Os dois grupos expressam de forma indiferente os reagentes CK16, CL3, CL5, CL7, CL11 e p63. Observa-se perda de expressão das CL1 e 4 nos TC em comparação aos TM. Há ainda uma significativa redução da expressão do CD34 entre os TC. Por outro lado, o índice de proliferação celular pelo Ki67 mostrou-se um marcador inútil para a distinção entre as formas benigna e maligna.
- c) O TC, portanto, apresenta-se como um tumor que expressa a CK 16, que evidencia a sua origem folicular. Mantém expressão das claudinas 3 e 7, presentes normalmente na pele. Não demonstrou elevação do p63. Por outro lado, o TC apresenta redução ou ausência da expressão das CL1 e 4 e do CD 34, marcadores de diferenciação celular.

8 Bibliografia

Agarwal R et al. Silencing of Claudin-11 Is Associated with Increased Invasiveness of Gastric Cancer Cells. Plos Medicine 2009; 4: e8002.

Al-Daraji W, Husain E, Zelger BG e Zelger B. A Practical and Comprehensive Immunohistochemical Approach to the Diagnosis of Superficial Soft Tissue Tumors. Int J Clin Exp Pathol 2009; 2: 119-31.

Allee JE; Cotsarelis G; Solky B; Cook JL. Multiply Recurrent Trichilemal Carcinoma with perineural invasion and cytokeratin 17 positivity. Dermatol Surg. 2003; 29: 886-9.

Alsaad KO, Obaidat NA, Ghazarian D. Skin adnexal neoplasms—part 1: An approach to tumours of the pilosebaceous unit. J Clin Pathol 2007;60:129–44.

Amoh Y.; Li L; Katsuoka K; Hoffman R.M.. Embryonic development of hair follicle pluripotent stem (hfPS) cells. Med Mol Morphol 2010; 43:123–127.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, Ayala F, Sato Y Ferreira SS, Nascimento CF, Soares FA. Tissue microarrays: high throughput and low cost available for pathologists. J Bras Patol Med Lab 2007; 43: 55-60.

Billingsley EM; Davidowski TA; Maloney ME. Trichilemmal carcinoma. J Am Acad Dermatol. 1997; 36: 107-9.

Brandner J.M.; Kief S.; Wladykowski E.; Houdek P.; Moll I. Tight Junction Proteins in the Skin. Skin Pharmacol Physiol 2006;19:71–77

Brandner J.M.; McIntyre M.; Kief S.; Wladykowski E.; Moll I. Expression and localization of tight junction-associated proteins in human hair follicles. Arch Dermatol Res 2003, 295: 211–21.

Chan KO; Lim IJ; Baladas HG; Tan WT. Multiple tumor presentation of trichilemmal carcinoma. Br J Plastic Surg. 1999; 52: 665-7.

Cohn ML; Goncharuk VN; Diwan AH; Zhang PS; Shen SS; Prieto VG. Loss of claudin-1 expression in tumor-associated vessels correlates with acquisition of metastatic phenotype in melanocytic neoplasms. J Cutan Pathol 2005; 32:533-6.

Cotton D. Troublesome tumours 1: Adnexal tumours of the skin. J Clin Pathol 1991;44:543-48

Crowson et al. Malignant neoplasms of the folliculosebaceous apparatus. Malignant adnexal neoplasms. Modern Pathol 2006; 19:93-126.

Fernandez-Figueras MT; Casalots A; Puig L; Llatjos R; Ferrandiz C; Arisa A. proliferating trichilemmal tumor: p53 immunoreactivity in association with p57 kip1 over-expression indicates a low-grade carcinoma profile. Histopathol 2001; 38: 454-7.

Furuse M. Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010;2: a002907

Garret AB; Scott KA. Trichilemmal carcinoma: a case report of a rare skin cancer occurring in a renal transplant patient. Transplantation. 2003; 76: 1131-7.

Garrett AB; Azmi FH; Ogburia KS. Trichilemmal Carcinoma: a rare cutaneous malignancy: a report of two cases. Dermatol Surg. 2004; 30: 113-5.

Güerrissi JO e Quiroga JP. Adnexal carcinomas of the head and neck. Indian J Plast Sur 2008; 41: 229-34.

Haas N; Audrig H; Sterry W. carcinoma arising in a proliferating trichilemmal cyst expresses fetal and trichilemmal hair phenotype. *Am J Dermatopathol* 2002; 24: 340-4.

Hewitt K.J.; Agarwal R.; Morin P.J. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 2006, 6:186

Ikeda T; Tsuru K; Hayashi K; Ichihashi M; Ueda M. Hypercalcemia of malignancy associated with trichilemmal carcinoma in burn scar. *Acta Derm Venereol* 2000; 80: 396-7.

Inca 2010. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>.

Jin HR, Lee JY, Lee DW, Shin SO, Choi YS, Yoo SJ, Yoon TY. Primary Facial Skin Cancer: Clinical Characteristics and Surgical Outcome in Chungbuk Province, Korea. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 279-82.

Jo JH; Ko HC; Jang HS; Kim MB; Oh CK; Kwon KS. Infiltrative trichilemmal carcinoma treated with 5% imiquimod cream. *Dermatol Surg*. 2005; 31: 973-6.

Joey E. Lai-Cheong¹, Ken Arita^{1,2} and John A. McGrath. Genetic Diseases of Junctions. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 2713–25

Kanitakis J, Bouchany D, Faure M, Claudy A. Expression of the hair stem cell-specific keratin 15 in pilar tumors of the skin. *Eur J Dermatol* 1999; 9: 363-65.

Ko T; Tada H; Hatoko M; Muramatsu T; Shirai T. Trichilemmal carcinoma developing in a burn scar: a report of two cases. *J Dermatol*. 1996; 23: 463-8.

Kurokawa I et al. Cytokeratin expression in trichilemmal carcinoma suggests differentiation towards follicular infundibulum. *In vivo* 2006; 20: 583-5.

Kurokawa I; Nishijima S. Kusumoto K; Senzaki H; Shikata N; Tsubura ^a Trichilemmoma: an immunohistochemical study of cytokeratins. *Br J Dermatol* 2003; 149:99-104.

Lai TF; Huilgol SC; James CL; Selva D. Trichilemmal carcinoma of the upper eyelid. *Acta Ophthalmol Scand.* 2003; 81: 536-8.

Laochumroonvorapong P; Kokta V; Quan MB. Trichilemmal carcinoma in an African American. *Dermatologic Surgery.* 2002; 28: 284-6.

Leonardi CL, Zhu WY, Kinsey WH, Penneys NS. Trichilemmomas are not associated with human papillomavirus DNA. *J Cutan Pathol* 1991, 18:193-7.

Lopardo T., Iacono N.L., Marinari B., Giustizieri M.L., Cyr D.G., Merlo G., Crosti F., Costanzo A., Guerrini L. Claudin-1 Is a p63 Target Gene with a Crucial Role in Epithelial Development. *Plos Medicine* 2008, 3: e2715.

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Pereira CM, Carvalho AL, Kowalski LP, Soares FA. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. *J Clin Pathol.* 2010b; 63:609-14.

Lourenço SV. Melanoma primário da mucosa oral como modelo de investigação em patologia geral e aplicada: análise clínico-morfológica, pesquisa de marcadores biológicos e estabelecimento de células cultivadas in vitro. Tese de livre-docência apresentada na USP. 2010a.

Mello, ES e Alves, VAF. Marcadores de proliferação celular. EM Manual de Imunoistoquímica 1999 SBP. Editores Venâncio A. F. Alves, Carlos Eduardo Bacchi e José Vassallo.

Monteagudo C. A trichilemmal carcinoma arising from a proliferating trichilemmal cyst: a response. Human Pathol 1999; 30: 247-8.

Moretti S, Massobrio R, Brogelli L, Novelli M, Giannotti B e Bernengo MG. Ki67 Antigen Expression and HLA-DR Antigen Expression in Melanocytic Lesions. J Inv Dermatol 1990; 95: 320-4.

Morita K, Sasaki H, Furuse K, Furuse M, Tsukita S, Miyachi Y. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Experimental Dermatology* 2003; 12: 289–295

Morita K., Sasaki H., Fujimoto K., Furuse M, eTsukita S. Claudin-11/OSP-based Tight Junctions of Myelin Sheaths in Brain and Sertoli Cells in Testis. The Journal of Cell Biology 1999, 145: 579-88.

Morita K; Tsukita S; Miyachi Y. Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. Br J Dermatol 2004; 151: 328-34.

Nakatani C; Muramatsu T; Shirai T. Localized pretibial pemphigoid associated with trichilemmal carcinoma. J Dermatol. 1998; 25: 448-52.

Niessen CM. Tight Junctions/Adherens Junctions: Basic Structure and Function. J Invest Dermatol 2007; 127: 2525–32.

Oyama N, Kaneko F. Trichilemmal carcinoma arising in seborrheic keratosis: A case report and published work review. J Dermatol 2008; 35: 782-85.

Peltonen S; Riehkainen J; Pummi K; Peltonen J. Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis. Br J Dermatol 2007; 156:466-72.

Peltonen S; Riehkainen J; Pummi K; Peltonen J. Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis. Br J Dermatol 2007 156, pp466–472

Proksch E; Brandner JM; Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. Experimental Dermatology 2008; 17: 1063–1072

Reis JP; Tellechea O; Cunha MF; Baptista AP. Trichilemmal carcinoma: review of 8 cases. J Cutan Pathol. 1993; 20: 44-9.

Rohwedder A, Keminer O, Hendricks C, Schaller J. Detection of HPV DNA in trichilemmomas by polymerase chain reaction. J Med Virol 1997, 51:119-25.

Sampaio SAP e Rivitti EA. Dermatologia. 3ª. Edição. Artes Médicas, 2007.

Santos Jr IT, Rego ARBC, Sobral APV. Evaluation of alternative technique combinations of building and preparation of tissue microarrays blocks. J Bras Patol Med Lab 2010; 46: 47-53.

Sasaki Y; Shimizu H; Nishikawa T. trichilemmal carcinoma in situ. Acta Derm Venereol 1998; 78:

Sawaguchi T, Franco P, Kadhim H, Groswasser J, Sottiaux M, Nishida H, Kahn A. Correlation between the Ki-67 antigen in the brainstem and physiological data on sleep apnea in SIDS victims. Pathophysiol 2004; 10: 223–228.

Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin Family of Proteins and Cancer: An Overview. J Oncol 2010; 2010: 541957.

Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's Disease and Breast Carcinoma. Hum Pathol 2004; 35:1531-1536.

Song MG; Min HG; Jung SY; Yang JM; Lee ES. Trichilemmal carcinoma with a cutaneous horn. Br J Dermatol. 2000; 143: 646-7.

Stierman S, Chen S, Nuovo G, Thomas J. Detection of human papillomavirus infection in trichilemmomas and verrucae using in situ hybridization. J Cutan Pathol 2010, 37:75-80.

Takata M; Rehman I; Rees JL. A trichilemmal carcinoma arising from a proliferating trichilemmal cyst: the loss of the wild-type p 53 is a critical event in malignant transformation. Human Pathol 1998; 29: 193-5.

Takeuchi Y; Tamura A; Kamiya M; Fukuda T; Ishikawa O. Immunohistochemical analyses of p63 expression in cutaneous tumors. Br J Dermatol 2005; 153: 1230-2.

Tebbe B; Mankertz J; Schwarz C; Amasheh S; Fromm M; Assaf C; Schultz-Ehrenburg U; Ruderisch HS; Schulzke JD; Orfanos CE. Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins- Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. Arch Dermatol Res 2002; 294 :14–18.

Trempeus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW. Enrichment for Living Murine Keratinocytes from the Hair Follicle Bulge with the Cell Surface Marker CD34. J Inv Dermatol 2003; 120: 501-511.

.

Troy TC; Turksen K. The targeted overexpression of a Claudin mutant in the epidermis of transgenic mice elicits striking epidermal and hair follicle abnormalities. *Mol Biotech* 2007; 36:166-74.

Watson REB, Poddar R, Walker JM, McGuill I, Hoare LM, Griffiths CEM e O'Neill CA. Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *J Pathol* 2007, 212: 450–458.

Weedon D. Tumors os cutaneous appendages. In: *Weedon's Skin Pathology*. 3a. edição, Elsevier 2010, página 767-768.

Wong TY; Suster S. Tricholemmal carcinoma- a clinicopathologic study of 13 cases. *Am J Dermatopathol*. 1994; 16: 463-73.

Yuki T., Haratake A., Koishikawa H., Morita K., Miyachi Y. e Inoue S. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Experimental Dermatol* 2007, 16, 324–330